



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

랫트에 Paraquat로 유발한 산화적 폐손상에서
Betaine의 보호 효과

Protective Effects of Betaine against Paraquat-Induced
Oxidative Lung Injury in Rats

2019 년 8 월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학 전공
나 종 덕

국문 초록

Betaine 은 수용성 물질로서 간질환에 대한 전통적인 치료약물로 사용되었다. 실험적으로도 여러 독성물질로 유발시킨 간손상 모델에서 보호효과를 확인하였으나 간 이외의 장기에서는 연구된 바가 거의 없다. 그 이유는 betaine 을 대사하는 betaine homocysteine methyl transferase (BHMT) 가 간 이외의 장기에서는 발현되지 않거나 활성이 간에 비하여 현저히 낮기 때문이다. 본 연구에서는 랫트에 paraquat 을 투여하여 발생한 산화적 스트레스로 유도된 폐섬유화 모델에서 betaine 의 보호효과를 확인하였다. Paraquat 를 투여하기 2주 전부터 betaine 을 음용수에 1 % 의 농도로 희석하여 투여하였다. Paraquat 는 0.3 mg/500 μ l/kg 의 농도로 기관지를 통하여 폐에 직접 주입하였다.

몸무게 대비 폐무게의 비율은 염증진행구간(4일)에서부터 paraquat 에 의해 증가하였다. 섬유화진행구간(14일)에서 섬유화 지표인 4-hydroxyproline 과 TGF- β 1 은 paraquat 에 의한 증가가 betaine 투여에 의해 유의적으로 감소하였고, 조직 염색을 통해서 확인한 섬유화 병변도 완화되었다. 염증지표인 serum TNF- α , tissue TNF- α , serum IL-1 β 를 측정한 결과, 염증진행구간(4일)에서 paraquat 에 의한 tissue TNF- α 의 증가가 betaine 에 의해 감소하였다. 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일)에서 comet assay 을 통하여 paraquat 에 의한 림프구의 DNA 손상이 관찰되었으며, HO-1, 그리고 iNOS 의 발현 증가를 통하여 산화적 손상이 증가함을 확인하였다. 또한 TOSC assay를 통하여 hydroxyl radical, peroxy radical 과 peroxy nitrite 대한 제거능 역시 paraquat 에 의해 유의적인 감소를 확인하였다. 이러한 산화적 스트레스 증가는 모두 betaine 투여에 의하여 완화되었다.

이와 같은 보호효과에 대한 원인을 알아보기 위하여 황함유 아미노산 대사과정을 조사하였다. 섬유화진행구간(14일)에서 betaine 투여에 의한 methionine 의 증가가 확인되었고, methionine adenosyl-transferase II (MATII) 의 발현은 paraquat 와 betaine 의 투여에 의해 급격한 증가를 보였다. S-adenosylmethionine (SAM) 은 betaine 투여에 의해 유의적으로 증가하였고, SAM 의 영향을 받는 polyamine 역시 paraquat 에 의한 감소가 betaine 에 의해 유의적으로 증가하였다. SAH 는 변화가 없었으나 homocysteine 은 paraquat 와 betaine 병용투여군 에서 유의적인 증가를 보였다. Paraquat 투여에 의한 cysteine dioxygenase (CDO) 와 glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 의 감소와 함께 cysteine 은 증가하였고, betaine 투여에 의한 GCLC 의 증가는 cysteine 을 감소시키고 환원된 GSH 을 증가시켰다. 한편, 염증진행구간(4일)에서는 paraquat 투여에 의해 SAM, polyamine, SAH, homocysteine, 그리고 cysteine 이 paraquat 에 의해 유의적인 증가를 보였지만, betaine 투여에 의한 변화는 보이지 않았다.

이러한 결과는 paraquat 투여에 의해 황함유 아미노산을 통한 보호기전을 보여줬고, betaine 이 간 이외의 장기인 폐에서도 이러한 보호기전 조절을 통해 폐손상에 대하여 약리학적 효과를 갖는다고 보고 있다.

주요어: Betaine, Glutathione, Methionine, S-containing amino acid metabolism, Polyamine, Antioxidant, Paraquat, Pulmonary fibrosis, Oxidative stress

학번: 2013-23459

목 차

국문 초록	1
목 차	3
List of Figures and Tables	7
List of Abbreviations	11
서 론	13
1. 폐섬유화	14
1.1. Paraquat	16
2. 황함유 아미노산 대사	19
3. Betaine	23
3.1. 생리작용	26
3.2. 대사	28
4. Glutathione	29
4.1. Glutathione 의 기능	30
4.2. Glutathione 의 합성	31
5. Polyamine	33
5.1. Polyamine 의 대사	34
실험재료 및 방법	38
1. 실험재료	38

1.1. 시약 및 화학물질	38
1.2. 항체	39
2. 동물실험모델	40
3. 혈액 및 조직의 분획 분리	41
3.1. 혈장 및 혈청의 분리	41
3.2. 폐의 실험 검체 준비	41
4. 폐손상 관련지표 측정	42
4.1. 4-hydroxyproline 의 함량 측정	42
4.2. Proinflammatory cytokine 의 함량 측정	43
4.2.1. Serum cytokine ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$ 1) 의 함량 측정	43
4.2.2. Tissue $TNF-\alpha$ 의 함량 측정	43
4.3. 림프구의 산화적 DNA 손상 측정	44
4.3.1. 림프구 분리	44
4.3.2. Comet Assay	44
4.4. Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC) assay	45
4.5. Histopathological examination	46
5. 황함유 아미노산과 관련 대사체의 측정	47
5.1. GSH 및 GSSG 측정	47
5.2. Cysteine 함량 측정	47

5.3. SAM 및 SAH 함량 측정	48
5.4. Methionine, hypotaurine, taurine, ornithine 함량 측정	48
5.5. Homocysteine 함량 측정	49
5.6. Polyamines 함량 측정	50
6. 단백질 발현 측정	51
결 과	53
Part I. 랫트의 폐에서 시간대별 paraquat 의 영향	53
1. Paraquat 투여로 유발된 폐의 무게 변화	54
2. Paraquat 투여로 유발시킨 폐 병변 및 섬유화 변화	58
3. Paraquat 투여로 유발된 산화적 스트레스 변화	61
4. Paraquat 투여에 의해 유발된 폐의 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화	63
5. Paraquat 에 의해 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화	66
Part II. Paraquat 으로 유발시킨 폐손상에 대한 betaine 의 효과 ...	68
1. Paraquat 투여 4 일 후, 유도된 몸무게와 폐무게 변화에 대한 betaine 의 효과	69
2. Paraquat 투여 2 주 후, 유도된 몸무게와 폐무게 변화에 대한 betaine 의 효과	73
3. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 병변 및 섬유화에 대한 betaine 의 영향	77

4. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 병변 및 섬유화에 대한 betaine 의 영향	82
5. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 염증반응에 대한 betaine 의 영향	88
6. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 염증반응에 대한 betaine 의 영향	92
7. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 산화적 스트레스에 대한 betaine 의 영향	96
8. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 산화적 스트레스에 대한 betaine 의 영향	100
9. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화에 대한 betaine 의 영향	104
10. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화에 대한 betaine 의 영향	107
11. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화에 대한 betaine 의 영향	110
12. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화에 대한 betaine 의 영향	112
고 찰	114
결 론	131
참고 문헌	133
Abstract	164

List of Figures and Tables

Table 1. Changes of sulfur containing amino acid and related substance in the lung of rats after PQ instillation	65
Table 2. Score of severity in lung lesions (4 day)	80
Table 3. Score of severity in lung lesions (2 wk)	85
Table 4. Changes of sulfur containing amino acid and related substances in the lung of rats at 4 day after PQ instillation ~	106
Table 5. Changes of sulfur containing amino acid and related substance in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	109
Figure 1. Schematic representation of the mechanism of paraquat toxicity	18
Figure 2. Methionine cycle and transsulfuration pathway	22
Figure 3. Oxidation of choline to betaine	25
Figure 4. Polyamine structures, biosynthesis, and interconversion	3 7
Figure 5. Body weight changes after PQ instillation	55
Figure 6. Lung weight changes after PQ instillation	56
Figure 7. Lung/Body weight ratio changes after PQ instillation	5 7
Figure 8. Histopathological changes in the lung rats after PQ instillation (H&E, MT)	59
Figure 9. Level of 4-hydrxyproline in the lung rats after PQ	

instillation	60
Figure 10. Oxidative DNA damage changes in lymphocyte after PQ instillation	62
Figure 11. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism in the lung of rats after PQ instillation	67
Figure 12. Body weight at 4 day after PQ instillation	70
Figure 13. Lung weight at 4 day after PQ instillation	71
Figure 14. Lung/body weight ratio at 4 day after PQ instillation	7 2
Figure 15. Body weight at 2 wk after PQ instillation	74
Figure 16. Lung weight at 2 wk after PQ instillation	75
Figure 17. Lung/body weight ratio at 2 wk after PQ instillation	7 6
Figure 18. Histopathological changes in the lung rats at 4 day after PQ instillation (H&E)	78
Figure 19. Histopathological changes in the lung rats at 4 day after PQ instillation (MT)	79
Figure 20. Serum TGF- β 1 levels at 4 day after PQ instillation	8 1
Figure 21. Histopathological changes in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	83
Figure 22. Histopathological changes in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	84

Figure 23. 4-hydroxyproline in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	86
Figure 24. Serum TGF- β 1 levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	87
Figure 25. Serum IL-1 β levels at 4 day after PQ instillation	89
Figure 26. Serum TNF- α levels at 4 day after PQ instillation	90
Figure 27. Tissue TNF- α levels at 4 day after PQ instillation	91
Figure 28. Serum IL-1 β levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	93
Figure 29. Serum TNF- α levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	94
Figure 30. Tissue TNF- α levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	95
Figure 31. Oxidative DNA damage in lymphocyte at 4 day after PQ instillation	97
Figure 32. Protein expression of HO-1, NF- κ B, and iNOS in the lung of rats at 4 day after PQ instillation	98
Figure 33. Specific TOSC in the lung of rats at 4 day after PQ instillation	99
Figure 34. Oxidative DNA damage in lymphocytes 2 wk after PQ instillation	101

Figure 35. Protein expression of HO-1, NF- κ β , and iNOS in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	102
Figure 36. Specific TOSC in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	103
Figure 37. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism in the lung of rats at 4 day after PQ instillation	111
Figure 38. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism int the lung of rats at 2 wk after PQ instillation	113
Figure 39. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 4 day after PQ instillation	128
Figure 40. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 14 day after PQ instillation	129
Figure 41. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 14 day after PQ instillation with betaine intake	130

List of Abbreviations

BHMT	Betaine–homocysteine methyltransferase
C β S	Cystathionine beta–synthase
CDC	Cysteine sulfonate decarboxylase
CDO	Cysteine dioxygenase
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
C γ L	Cystathionine γ –lyase
ECM	Extracellular matrix
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
GAPDH	Glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase
GCLC	Glutamate–cysteine ligase, catalytic subunit
GSH	Glutathione
H&E	Hematoxylin and eosin
HO–1	Heme oxygenase –1
HPLC	High performance liquid chromatography
HuR	Human antigen R
IL–1 β	Interleukin –1 beta
iNOS	Inducible isoform of nitric oxide synthase
MAT	Methionine adenosyltransferase
MDA	Malondialdehyde

MT	Masson' s trichome
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing protein 3
OTM	Olive tail moment
PQ	Paraquat
ROS	Reactive oxygen species
SAH	<i>S</i> -Adenosylhomocysteine
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionine
SOD	Superoxide dismutase
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TOSC	Total Oxyradical Scavenging Capacity
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

서론

폐질환은 독성물질, 자가 면역, 약물, 감염, 외상성 손상 등에 의해 초래되고, 폐포의 환경 이상과 비정상적인 회복과정을 동반하는 점진적이고 치명적인 질병이다 (Schwartz et al., 1994). 폐질환의 발병에는 나이, 유전적 감수성, 주위 환경과 같은 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다 (Thannickal et al., 2004). 최근, 현대 사회의 급속한 발전과 함께 도시화, 산업화에 따르는 공기오염은 해가 갈수록 심각해지고 있는 상황이다. World Health Organization ambient air pollution database 에 따르면, 도시지역에서 거주하고 있는 인구 80 % 이상이 WHO 기준을 초과하는 오염된 공기의 노출에 의해 만성적 또는 급성 폐질환을 갖고 있다고 한다. 또한 ‘전세계 사망원인 Top 10’ 에 따르면 폐 관련 질환이 3, 4, 6 위를 차지하고 있으며 그 수를 합치면 두 번째 사망원인인 stroke 보다 높은 것으로 알려져 있어 세계적으로 폐 질환의 심각성은 사회적으로 중요한 문제로 주목받고 있다 (2016, 2017 WHO 보도자료). 폐는 호흡기 기관으로써 외부공기 중의 산소를 얻어 혈액에 공급해 주고, 혈액이 운반한 이산화탄소를 몸 밖으로 내보내는 기능을 한다. 이를 ‘가스교환’ 이라고 부르며 폐포에서 이루어진다. 따라서 다른 장기 보다 높은 분압의 산소 및 외부 물질의 노출에 의해 발생하는 활성산소종에 의해서 직접적 또는 간접적으로 폐질환을 유발시킨다고 알려져 있다 (Kirkham and Barnes 2013; Wilson and Wynn 2009; Zuo et al., 2014). 폐질환에 의한 손상이 지속되는 경우 자가치유 과정이 과도하게 발생하게 되어 폐섬유화가 발생하게 된다. 이러한 폐섬유화 질환의 유병률을 정확하게 측정하긴 힘들지만 천식의 경우 미국에서 5 분의 1 의 비율로 발생을 하고, 특발성 폐섬유화증은 매년 3 만4천여명이 새로 발병을 한다 (Raghu et al., 2006). 이 밖에도 낭포성 폐병, 경피증, 간질성폐질환, 만성폐쇄성폐질환과 같은 폐섬유화 질환은 심하게는 생존기간이 진단 이후 3 ~ 5 년인 것으로 알려져 있다

(Wilson and Wynn 2009). 폐섬유화 치료에는 염증/자가치유 매개체인 cytokine 의 기전을 겨냥하는 항염증 (Abdelaziz et al., 2005; du Bois 2005; Selman et al., 2004) 및 면역억제제 (Selman et al., 2001) 가 주로 사용되는데 이러한 약물치료에 불응 또는 부작용이 발생하는 경우가 많다 (Anderton et al., 2011; Vitsky et al., 2009). 최근 폐섬유화의 발생기전을 이해하는 데 있어 근본적 원인인 산화적 스트레스와 관련한 연구가 상당수 진행되고 있으며, 폐섬유화에 대한 항산화 물질의 효과가 많은 실험을 통하여 밝혀지고 있다 (Chen et al., 2015; Day 2008; Li et al., 2015; Zhang et al., 2014). 하지만 현재까지 임상적으로 항산화 물질을 통한 폐섬유화증의 뚜렷한 치료법이 존재하지 않았으므로, 폐섬유화증의 발생기전에 대한 이해와 더불어 새로운 치료법에 대한 접근이 필요하다.

1. 폐섬유화

폐섬유화는 폐포나 폐포 간질에 염증세포의 침윤, 부종, 삼출, 섬유아세포의 과도한 증식과 더불어 collagen, proteoglycan, fibronectin, glycoproteine 과 같은 extracellular matix (ECM) protein 의 축적, collagenous fiber 의 과도한 침착 등이 특징이며, 폐실질 조직의 파괴가 발생하고 이런 병리조직학적 변화에 의해 가스교환 장애와 제한성 호흡이 발생하는 병변으로, 기전에 대한 다양한 연구에도 불구하고 아직 그 원인이 확실하지 않다 (Strieter 2005).

폐섬유화의 기전을 밝히기 위하여 사람과 동물에서 폐손상을 유발하는 독성물질에 대해 많은 실험적 연구가 이루어졌다. 산업현장에서 발생하는 독성물질로는 asbestos fiber 와 silica (Driscoll et al., 1995; Kawanami et al., 1995; Ross and Murray 2004) 가 있고, 합성물질 중에서는 제초제로 널리 쓰이는 paraquat (Toner et al., 1970;

Smith 1971; Smith et al., 1974) 이 있다. 또한 항부정맥제인 amiodarone (Sobol and Rakita 1982; Cantor et al., 1984) 과 항암제인 bleomycin (Adamson and Bowden 1977; Clark and Kuhn 1982), cyclophosphamide (Gould and Miller 1975; Morse et al., 1985) 뿐만 아니라 항암치료에 사용되는 전리방사선 (Jack et al., 1996; Fleckenstein et al., 2007; Vujaskovic et al., 2001) 또한 폐 섬유화를 유발한다고 한다.

폐섬유화의 발생과정에서 염증세포들의 상호작용과 복잡한 면역학적 기전을 통한 발생원인에 대해 만성적인 염증반응을 강조한 연구결과가 보고되었다. In vitro 상에서 기니피그의 복강대식세포가 섬유아세포의 증식을 촉진하는 인자를 발견하였고 (Leibovich and Ross 1976), 사람의 폐포대식세포가 활성화 되어 분비된 인자가 섬유아세포의 증식을 유도하는 현상도 보였다 (Bitterman et al., 1982). 또한, 외부의 독성물질 침입에 의해 자극받은 대식세포가 prostaglandin E 를 생성하여 collagenase 생합성에 관여한다고 알려져 있으며 (Wahl et al., 1977), 폐포대식세포가 미생물, 면역 복합체와 반응하여 호중구에 대한 화학적 인자를 분비한다고 보고된 바 있다 (Gadek et al., 1980).

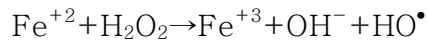
최근 폐섬유화의 기전과 관련하여 mesenchymal cells 와 ECM protein 이 풍부한 부분을 일컫는 fibroblastic foci 에 대한 관심에 집중되고 있다 (Kasai et al., 2005). 주로 fibroblast-like cells 와 myofibroblasts 로 이루어진 fibroblastic foci 는 섬유화가 진행된 폐에서 transforming growth factor beta 1 ($TGF-\beta 1$) 의 활성화도 관련이 있으며, 이는 fibroblast 가 myofibroblast 로 분화하는데 있어서 중요한 매개자 역할을 한다 (Hashimoto et al., 2001). 과발현된 활성화 $TGF-\beta 1$ 은 실험동물모델에서 폐섬유화를 유도하였다. (Sime et al., 1997). 기본적으로 $TGF-\beta 1$ 의 역할은 상처회복에 관여하는 주요 조절인자이지만 섬유아세포에서 활성산소종 발생을 유발시키기도 한다 (Waghray et al., 2005). 산화적 스트레스는 활성산소종과 항산화 작용사이의 불균형으로 정의할 수 있는데, 이것은 폐조직의 다양한 병리학적

기전에 치명적 원인으로 알려져 있기 때문에, 최근 폐섬유화와 발생기전 및 치료법에 있어서 산화적 스트레스에 초점을 둔 많은 연구가 진행되고 있다 (Rahman et al., 2006; Kinnula et al., 2005).

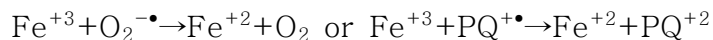
1.1. Paraquat

Paraquat 은 전세계에서 널리 쓰였던 제초제로서, 사람과 실험 동물에서 폐, 간, 신장, 심장과 같은 여러 장기에 독성을 갖는 물질로 알려져 있다 (Copland et al., 1974; Haley 1979). Paraquat 은 polyamine uptake system 을 통하여 폐조직내에 축적되고, 활성산소종을 지속적으로 발생시키는 redox cycle 을 유발하여 주로 폐 특이적 독성을 발생시킨다 (Dinis-Oliveira et al., 2006a; Dinis-Oliveira et al., 2006b). 주요 사망원인으로는 비가역적인 호흡장애이고, 폐조직 출혈, 부종, 저산소혈증, alveolar epithelial cells (type I and II pneumocytes) 와 bronchiolar clara cell 의 손상, air space 및 간질 내로 염증세포의 침윤, 섬유아세포의 증식과 콜라겐 합성 증대와 같은 병리학적 변화를 동반한다 (Bismuth et al., 1996; Greenberg et al., 1978). 또한 paraquat 경구 중독 시 장에서의 흡수는 빨리 일어나나 완전히 흡수되지 않고, 체내에서 대사되지 않은 채 대부분 신장으로 배설된다 (Bismuth et al., 1987). Paraquat 의 정확한 독성기전은 밝혀져 있지 않았으나, 지질과산화의 과발생 (Tomita and Okuyama 1994) 과 glutathione (GSH) 의 치명적인 고갈이 그 원인 및 결과로 제시되고 있다 (Eklow-Lastbom et al., 1986; Melchiorri et al., 1996). Paraquat 은 폐세포에서 “electron redox cycling” 과정을 통해 monocation radical ($PQ^{+\bullet}$) 로 환원되고, 동시에 NADPH 를 산화시킨다 (Figure 1). 결과적으로 paraquat 은 산소 자유분자와 반응하여 과산화물 (peroxide) 생성을 통하여 ROS 를 지속적으로 생산하는데 (Smith 1987), 특히 생성된 superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) 은

superoxide dismutase (SOD) 에 의하여 촉매되어 과산화수소 (H_2O_2) 로 환원되고, nitric oxide (NO^\bullet) 와 반응하여 peroxynitrite (ONOO^-) 를 생성한다. 계속해서 과산화수소는 Fenton 반응에 의해 강력한 산소 유리기인 hydroxyl radical (HO^\bullet) 이 되는데, hydroxyl radical 은 가장 강력한 산화제 중의 하나로서 산소 유리기에 의한 조직의 지질과산화 마지막 단계를 매개하는 중요한 산화제이다. 이러한 과정은 폐실질 조직에 치명적인 손상을 유발한다. 이 때 Fenton 반응은 철 이온에 의해 촉매되는 반응으로 그 과정은 다음과 같다.



생체 내에서 철 이온은 Fe^{+3} 의 형태로 축적되어 있으므로 Fenton 반응이 일어나기 위해서는 Fe^{+2} 의 형태로 환원되어야 하며, 이 과정은 Fe^{+3} 이 superoxide radical 이나 paraquat radical 과 반응을 통해 일어난다.



따라서 이러한 활성산소종을 발생시키는 반응을 통해 유발되는 산화적 손상을 작용점으로 세포수준에서 지질과산화 정도를 경감시키고, 폐의 콜라겐 합성을 감소시키는 치료전략에 대한 연구가 진행되었다 (Shahar et al., 1989; Kojima et al., 1992).

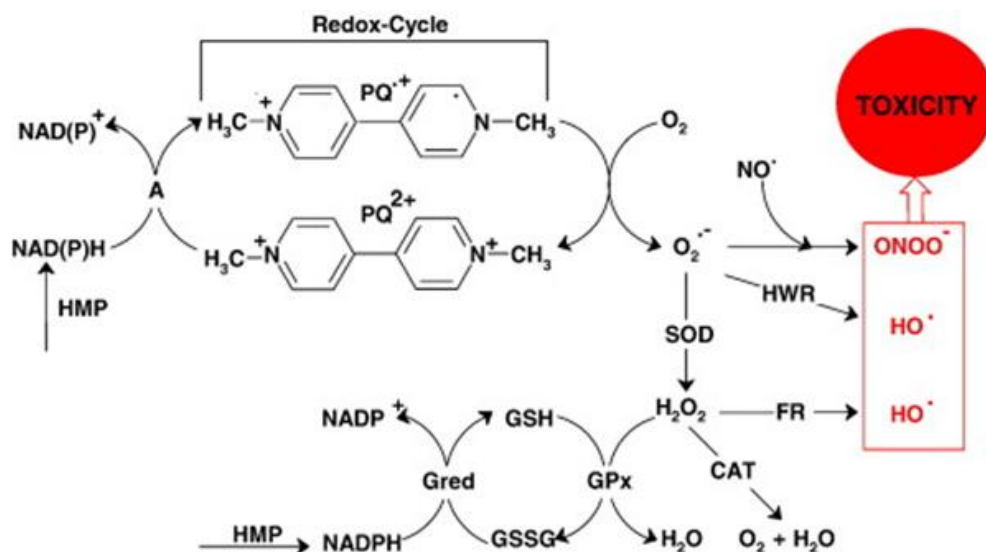


Figure 1. Schematic representation of the mechanism of paraquat toxicity. A, cellular diaphorases; SOD, superoxide dismutase or spontaneously; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; Gred, glutathione reductase; PQ^{2+} , paraquat; $\text{PQ}^{\cdot+}$, paraquat cation radical; HMP, hexosemonophosphate pathway; FR, Fenton reaction; HWR, Haber–Weissreaction. (Dinis–Oliveira et al., 2007)

2. 황함유 아미노산 대사

Methionine 은 transmethylation pathway 와 transsulfuration pathway 를 통해 cysteine 으로 전환되며 이것은 cysteine 생합성의 유일한 경로로 알려져 있다 (Mato et al., 1997). 간에서 methionine 은 간 특이적으로 발현하는 methionine adenosyltransferase I/III (MATI/III) 에 의해서, 간 이외의 장기에서는 대부분 methionine adenosyltransferase II (MATII) 에 의해서 S-adenosylmethionine (SAM) 을 합성하며 합성된 SAM 은 주로 생체 내의 다양한 methyl donor 로 사용된다 (Mato et al., 2008). SAM 은 다양한 생체반응에 필요한 methylation 후 S-adenosylhomocysteine (SAH) 을 생성하며 일부는 SAM decarboxylase (SAMDC) 를 통해 polyamine 합성에 사용되어진다 (Figure 2). SAH 은 SAH hydrolase 에 의해 가역적으로 homocysteine 과 adenosine 으로 전환된다. Homocysteine 은 remethylation 과 transsulfuration 의 상경적인 두가지 대사경로의 분기점에 위치하는 황함유 아미노산 대사의 중요한 조절단계 물질이며, 사람의 간에서 낮은 농도로 존재하지만 건강상태와 질병에 따라 농도가 증가한다 (Marti-Carvajal et al., 2017).

Homocysteine 이 cystathionine β -synthase ($C\beta S$) 의 작용에 의해 cystathionine 을 합성하게 되면 비가역적으로 methionine 의 황이 cysteine 으로 전달되는 반면 methionine synthase (MS) 나 간에서 주로 발현되는 betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) 에 의해 methionine 을 재합성 하면서 methionine cycle 이 유지된다 (Finkelstein and Martin 1984; Mudd and Poole 1975). Cystathionine 은 cystathionine γ -lyase (CGL) 의 작용을 받아 cysteine 을 합성한다 (Lu 2000). 다른 장기와는 달리 간은 $C\beta S$ 와 CGL 의 활성이 높은 편이어서 효과적으로 cysteine 을 합성할 수 있다. Cysteine 으로부터 taurine 의 합성은 cysteine dioxygenase

(CDO) 에 의해 촉매되는 cysteine sulfonate pathway 가 관여한다 (Cooper 1983). Cysteine 은 CDO 에 의해 cysteine sulfonate 로 산화되고 이것은 다시 cysteine sulfonate decarboxylase (CDC) 의 작용에 의해 hypotaurine 으로 대사된 후 자발적으로 taurine 으로 전환된다. Taurine 은 간질환 뿐만 아니라 여러 질환에서 최근 중요한 역할이 보고되고 있으며 그 기전으로는 kupffer cell inactivation 및 anti-oxidative activity 관련 작용이 보고되고 있다. 생성된 taurine 은 bile acid 와 결합하여 bile 로 배설되거나 혈액을 통해 urine 으로 배설된다. Hypotaurine 은 taurine 의 대사 전구체로서 antioxidant 로서의 작용이 보고되고 있다 (Aruoma et al., 1988; Mehta and Dawson 2001; Pecci et al., 2003; Shi et al., 1997). 한편 GSH 는 대표적인 내인성 항산화제로 cysteine 을 glutamate-cysteine ligase (GCL) 가 매개하여 GSH 가 합성된다. 간은 cysteine 으로부터 합성된 GSH 대부분을 혈액을 통해 유리하여 다른 장기에 공급한다. 혈액의 GSH 대부분은 간으로부터 유래한 것이며 다른 장기와 달리 간은 혈액의 GSH 를 흡수할 수 없다 (Hagen and Jones 1989). 이런 과정을 통해 간은 기관들 사이의 황함유 아미노산 및 그 대사체의 항상성 유지에서 중추적 역할을 수행한다.

이와 같이 간에서 일어나는 황함유 아미노산 대사는 체내의 methionine 대사 및 methylation 반응, GSH 과 taurine 합성에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 간질환에서 뿐만 아니라 간 이외의 장기에서도 다양한 병리현상에서 황함유 아미노산 대사체의 변화가 발생한다고 알려져 있고 산화적 스트레스가 과발생 하는 상태에서 GCL 효소활성을 증가시키는 물질을 투여하면 GSH 합성이 증가되어 보호작용을 갖는다고 알려져 있다 (Myhrstad et al., 2002). 황함유 아미노산 대사를 겨냥한 물질을 처리하였을 때 산화적 스트레스나 특정 병리상태의 완화가 보고되고 있기에 황함유 아미노산 대사가 약리학적 보호효과에 미치는 영향이 중요하다.

폐에서 일어나는 황함유 아미노산 대사는 아직 많이 연구되어

있지 않다. 하지만 nicotine 을 mice 에 투여하였을 때, SAM 농도의 현저한 감소와 polyamine 의 대사가 증가함을 확인하였다 (Shivji et al., 2005). 또한 Panayiotidis 의 연구에 따르면 폐의 epithelial 세포주인 A549 에 hyperoxia 조건을 가하였을 때, MATII 의 활성 및 발현 증가 및 methionine 의 흡수 역시 증가하여 SAM 의 생성을 증가시켰다. 이 결과 cysteine/GSH 의 합성이 유도됨을 확인하였다. 같은 세포주에 H₂O₂ 와 t-butOOH 를 농도별로 처리하여 1시간 뒤에 SAM 의 감소와 SAM/SAH 증가를 확인하였고, 아미노산에서는 methionine, serine, cystathionine, cysteine, GSH 이 농도 의존적으로 감소하였다 (Panayiotidis et al., 2006; Panayiotidis et al., 2004; Panayiotidis et al., 2009). 또한, 만성적 알콜투여에 의하여 acute respiratory disease syndrome (ARDS) 의 랫트 모델에서 SAM 투여에 의해 GSH 의 항상성을 유지시켜 손상을 완화하였다 (Holguin et al., 1998). 따라서 폐에 병적현상이 발생하면 황함유 아미노산 대사의 변화가 발생하며, 이러한 변화에 대한 항상성 유지 및 GSH 합성 증가는 폐손상 완화에 중요한 역할을 한다고 보여진다.

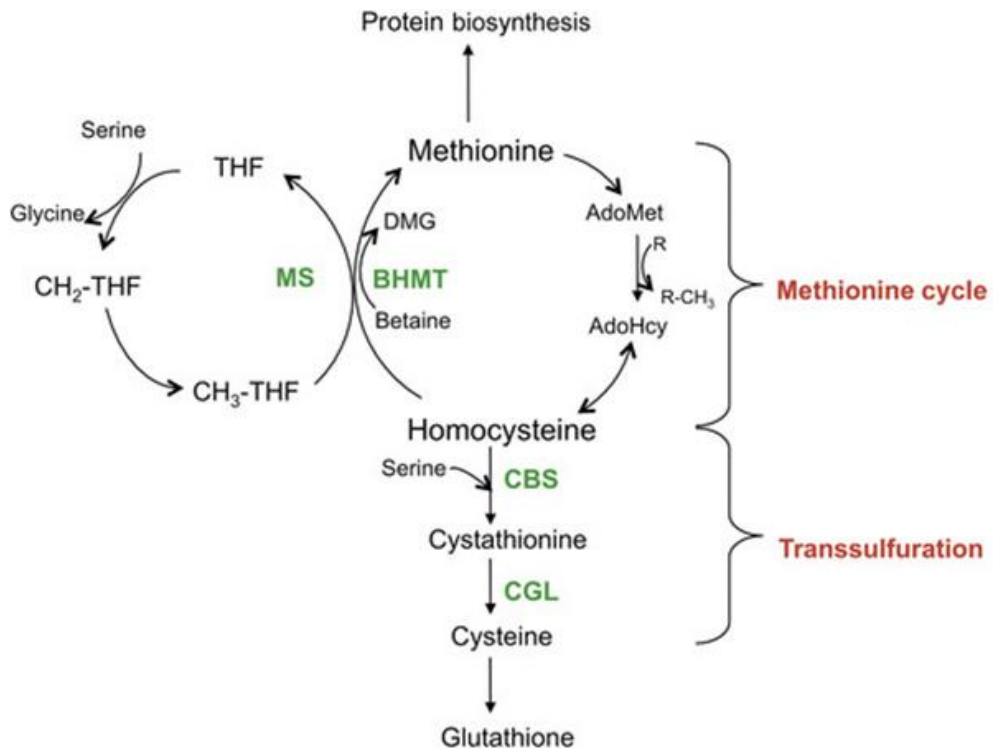


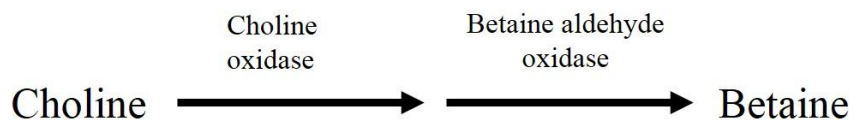
Figure 2. Methionine cycle and transsulfuration pathway. THF, tetrahydrofolate; CH₂-THF, methylene-tetrahydrofolate ; CH₃ - THF, methyl-tetrahydrofolate; MS, methionine synthase; BHMT, betaine-dependent homocysteine methyltransferase; CBS, cystathionine β synthase; CGL, cystathionine γ lyase.

3. Betaine

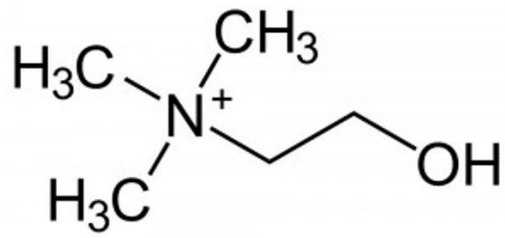
Betaine 은 중국 최고 의약서인 신농본초경(神農本草經) 에서 상약(上藥)으로 기재되어 있는 구기자(枸杞子, *lyciumchinense*) 의 열매에서 추출한 주요한 유효성분으로, 동양에서는 전통적으로 간기능 이상증상에 사용되어 왔다. Betaine 은 중성의 수용액에서 양쪽성을 갖는 4 급 아민이며, trimethylglycine, 또는 glycine betaine 으로도 불린다. Betaine 은 시금치, 밀배아, 밀겨, 뿐만 아니라 해양 연체동물에 많이 존재한다 (Ganesan et al., 2011). Betaine 은 일반적으로 하루에 9 ~ 15 g (평균 12 g) 의 섭취가 안전하다고 알려져 있고 쥐의 경우에는 일반 식이량 중 0 ~ 5 % 까지는 독성이 발견되지 않았다 (Hayes et al., 2003). 랫트의 간에서 betaine 농도는 약 2 ~ 4 mM, 혈중에서 20 ~ 70 μ M 이 존재하며, choline 의 비가역적인 산화과정을 통하여 생성된다. Choline 으로부터 betaine 합성은 2 가지 효소를 통하여 이루어진다 (Figure 3). 가장 많이 알려진 경로는 미토콘드리아에 존재하는 choline dehydrogenase (혹은 choline oxidase) 에 의해 betaine aldehyde 로 전환된 후 미토콘드리아 또는 cytoplasm 에서 betaine aldehyde dehydrogenase 에 의해 이차적인 산화과정을 거쳐 이루어지며, choline oxidase system 에 관여하는 효소들의 활성은 간과 신장에서 가장 높다 (Zeisel 1981; Grossman and Hebert 1989).

체내 betaine 의 전구체인 choline 은 식이에 의해서 또는 phosphatidylcholine (lecithin) 의 대사를 거치는 체내 합성에 의해 공급되며, 부분적으로 acetylcholine 및 betaine 으로 전환된다. 하지만 95 % 의 공급은 phosphatidylcholine 의 재합성에 의해서 이루어진다. Phosphatidylcholine 의 합성은 choline 이 인산화를 거쳐 cytidine diphosphocholine 으로 전환되고 이후 diacylglycerol 과의 축합을 통해 phosphatidylcholine 이 되는 반응과 phosphatidylethanolamine 이 phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) 작용에 의

하여 3 분자의 SAM 으로부터 methyl 기를 전달받아 phosphatidyl-choline 이 합성되는 과정으로 나누어지는데, 간에서는 choline 의 인산화 반응으로 인한 합성이 70 % 정도 더 많이 발생한다 (Zeisel 2006). PEMT 에 의한 phosphatidylcholine 의 생성은 SAM 의 소모 경로이며 homocysteine 생성경로라는 것이 PEMT 효소가 결핍된 동물 실험을 통하여 확인되었다 (Stead et al., 2006). Choline 의 인산화로부터 phosphatidylcholine 생성과정은 3 분자의 SAM 을 소모하는 과정으로서 SAM 의 소모와 homocysteine 농도를 증가시켜 betaine 농도에 영향을 주게 된다. 따라서 phosphatidylcholine 생성과정 2 가지 모두 체내 betaine 농도에 영향을 줄 수 있으며, betaine 농도에 의해 영향 받을 수 있을 것으로 추정된다.



Choline



Betaine

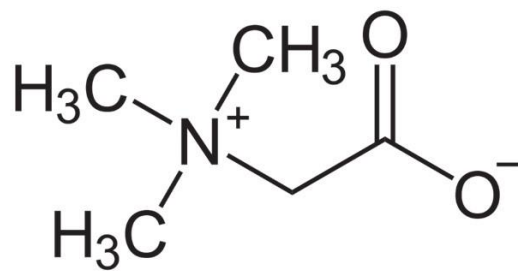


Figure 3. Oxidation of choline to betaine.

3.1. 생리작용

Betaine 의 생리작용은 세포 내 삼투압 조절 및 homocysteine 에 methyl 기를 전달하며 methionine 을 재합성하기 위해 필요한 methyl donor 로 알려져 있다 (Craig 2004). 삼투압 조절 측면에서 betaine 은 다양한 스트레스로부터 세포를 보호한다. 대표적으로, betaine 은 신장에서 뇨의 농축시 발생하는 삼투압의 변화로부터 세포를 보호하는 중요한 체내 삼투물질로 작용하며, 신장세포에서 뇨의 삼투압에 비례하여 증가한다 (Garcia-Perez and Burg 1991). 또한 betaine 은 kupffer cell 과 sinusoidal endothelial cell 의 organic osmolyte 로도 작용한다 (Horio et al., 2001; Olson 1998; Zhang et al., 1996a; Zhang et al., 1996b). 또한 betaine 은 세포의 기능 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정되며, 실제로 삼투압 변화에 의한 kupffer cell 의 활성화를 억제하였다 (Horio et al., 2001; Olson 1998; Zhang et al., 1996a; Zhang et al., 1996b).

황함유 아미노산에 대한 betaine 의 생리작용은 주로 간과 신장에서 homocysteine 에 methyl 기를 제공하며 methionine 으로 remethylation 함으로써, homocysteine 감소를 유발한다. 황함유 아미노산 대사에 있어서 homocysteine 의 대사는 중요하다. 즉, C β S 에 의한 cystathionine 의 합성은 비가역적으로 methionine 의 황을 cysteine 으로 전달하고, 반면 BHMT 와 MS 에 의한 methionine 의 재합성은 methionine 의 황을 유지한다. Betaine 의 황함유 아미노산에 대한 영향은 본 실험실에서 식수를 통해 3 주간 마우스에 betaine 을 공급한 실험을 통하여 연구되었다 (Kim and Kim 2005). Betaine 의 투여에 의해 methionine 이 증가하였고, MAT I/III 활성의 증가와 함께 SAM 과 SAH 모두 증가하였지만 SAM:SAH ratio 가 control 군에 비해 증가하여 체내 methylation capacity 가 증가하였다. Homocysteine 농도는 저하되었고, C β S 활성에는 영향을 미치지 않았다. Cysteine 생

성의 전구체인 cystathionine 농도는 감소하였고, CDO 활성화 간 및 혈액의 taurine 농도는 감소되어 cysteine 이 taurine 으로의 대사되는 경로는 억제되었다. 하지만 methionine cycle 과 transsulfuration reactions 에 일어나는 현저한 변화에도 불구하고 간의 cysteine 이나 GSH 농도에는 영향을 미치지 않았다. 그리고 같은 선행연구에서 황함유 아미노산 대사과정 조절이 갖는 약리학적 의의를 확인하기 위해 betaine 투여 실험모델에 간과 신장의 독성을 유발하는 chloroform 을 투여한 결과, betaine 의 투여는 chloroform 에 의한 간과 신장 독성을 현저하게 억제하였다 (Kim and Kim 2005). 또한 알코올, lipopolysaccharide, α -naphthylisothiocyanate, 그리고 dimethylnitrosamine 에 의해 유발된 간독성에 대해서도 betaine 투여에 의한 간 보호효과가 나타났다 (Jung et al., 2013; Kim and Kim 2002; Kim et al., 2009; Kim et al., 2005). 그리고 3 주간 고지방 식이를 사용하여 비알코올성 지방간을 유발한 본 실험실 선행연구에서 betaine 의 투여는 methionine, SAM:SAH ratio 를 증가시켰고, 고지방 식이에 의해 감소한 GSH 농도를 증가시켰다. 고지방 식이에 의한 교란된 황함유 아미노산의 대사를 betaine 투여가 정상화함으로써 간에서 유발된 산화적 스트레스를 억제하였다 (Kwon et al., 2009). 위의 선행연구결과는, 간손상 유발 동물실험모델에서 betaine 의 투여는 황함유 아미노산 대사를 개선시켜 간 보호효과를 나타냄을 암시한다. 따라서 betaine 대사 과정에 대한 연구는 독성물질에 의한 betaine 의 간 보호효과를 규명하는 중요한 연구가 된다. 또한 betaine 은 혈중 methionine 의 양을 증가시켜 신장의 황함유 아미노산 대사체들을 유의적으로 변화시켰다 (Kim et al., 2014). 2 주간의 식수를 통한 betaine 투여는 혈중 methionine 의 증가와 함께 신장의 methionine, SAM, 그리고 hypotaurine 이 증가함을 확인했다. 또한 간 이외의 장기에서 SAM 을 합성하는 MAT II 의 증가도 확인하였다. 이러한 연구결과는 간 이외의 장기에서도 betaine 투여가 황함유 아미노산 대사의 항상성을 유지시켜 약리학적 보호효과를 가질 수 있음을 암시한다.

3.2. 대사

Betaine 의 대사는 BHMT 에 의해서도 진행되지만, MS 에 의해서도 homocysteine 에 methyl 기를 전달한다. 이 반응은 5-methyltetrahydrofolate 의 methyl 기가 MS 에 의해 cobalamin (Vitamin B12) 에 전달되어 methylcobalamin 을 형성하고, 이후 homocysteine 의 methylation 에 대한 작용은 BHMT 와 MS 가 서로 상호보완하는 것으로 보고되고 있으며, choline 결핍식이에 의하여 betaine 의 농도가 낮아지게 되면, 더 많은 5-methyltetrahydrofolate 가 homocysteine 대사에 사용이 된다 (Varela-Moreiras et al., 1992). 이와 반대로 folate 또는 cobalamin 결핍이나 5-methylene-tetrahydrofolate 를 5-methyltetrahydrofolate 로 환원시키는 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 가 유전적으로 결핍될 경우 BHMT 의 활성이 증가되어 MS 와 상보적으로 작용한다 (Schwahn et al., 2003; Schwahn et al., 2004). 즉, folate 의 공급 감소로 인해 MS 의 활성이 감소되고, 따라서 증가된 homocysteine 의 제거를 위해 더 많은 betaine 이 소모됨을 의미한다.

BHMT 는 포유류의 간에 풍부하고, human, pig, guinea pig 의 신장에서도 발견되지만, 랫트의 신장에서는 극히 제한적으로 존재한다고 알려져 있다. 간에서 BHMT 의 활성은 betaine 과 choline 공급에 의하여 증가하며, methionine, SAM, 그리고 methylthioadenosine 등 에 의하여 그 활성이 억제되는 것으로 보고되었다 (Finkelstein et al., 1982a; Finkelstein and Martin 1984; Finkelstein et al., 1982b). 또한 hydrocortisone, cortisol, triamcinolone 과 같은 부신피질 호르몬 유사체에 의하여 BHMT 의 mRNA 및 활성이 증가되며, insulin 의 처리는 triamcinolone 에 의한 mRNA 발현 및 활성 증가를 억제하였다 (Jacobs et al., 1998; Ratnam et al., 2006; Wijekoon et al.,

2005). 반면 랫트에서는 알코올 식이에 의해 BHMT 의 발현 및 활성이 증가되어 betaine 고갈이 발생하고, 이로 인해 homocysteine 의 농도가 증가하였다 (Finkelstein et al., 1974). 한편, 간경화 및 간암과 같은 만성 간질환에서는 BHMT 의 발현이 감소되며, 이에 따라 homocysteine 의 농도 증가하게 된다 (Avila et al., 2000).

4. Glutathione

GSH 은 glycine, L-glutamic acid, 그리고 L-cysteine 으로 이루어진 tripeptide 로서 대부분의 미생물, 식물 그리고 모든 포유동물의 조직에 존재하는 물질이다. 포유동물의 조직에서 0.5 ~ 10 mM 의 농도로 존재하는데, 특히 간에서 고농도로 (5 ~ 10 mM) 존재하고, 세포 밖의 GSH 농도는 상대적으로 낮은 편이다 (eg. 2 ~ 20 μ mol/L plasma). GSH 는 thiol-환원형 (GSH) 과 disulfide-산화형 (GSSG) 의 형태로 존재한다 (DeLeve and Kaplowitz 1991). GSH 의 80 ~ 90 % 는 세포질에 존재하며, 10 ~ 15 % 는 mitochondria, 그 외 소량은 endoplasmic reticulum (ER) 내에 존재한다 (Lu 1999). ER 내의 GSH 과 GSSG 의 비율은 3:1 정도이지만, 세포질과 mitochondria 에서는 GSH 이 GSSG 의 10 배 이상으로 존재한다 (Hwang et al., 1992; Meredith and Reed 1982). GSH 의 sulfhydryl (-SH) group 은 생체 내에서 항산화 방어능을 발휘하는데 필수적인 구조이다. GSH 는 친전자성 물질의 무독화, thiol status 를 유지하여 산화적 스트레스에 의한 단백질 -SH group 의 산화 방지, free radical 제거, cysteine 의 공급, DNA 합성 및 면역기능 조절 등의 다양한 역할을 수행하고 있다 (DeLeve and Kaplowitz 1991; Hutter et al., 1997; Suthanthiran et al., 1990).

4.1. Glutathione 의 기능

GSH 의 주요기능은 대표적으로 외인성 물질 및 그 대사체를 무독화 시키는 것이다. 반응성이 강한 친전자성 물질들은 세포내 분자들과 공유결합 및 radical 을 형성하여 그 기능을 저해하고 세포에 손상을 줄 수 있는데, GSH 는 이러한 물질들과 자발적으로 혹은 GSH S-transferase (GST) 가 매개하여 GSH 포함체를 형성함으로써 무독화시키게 된다 (DeLeve and Kaplowitz 1991; Lu 1999). 이러한 포함체들은 혈액이나 담즙으로 빠져나가며, γ -glutamyl-transpeptidase (GGT) 에 의해 γ -glutamyl 기가 떨어져 나가고 그 후 dipeptidase 에 의해 cysteine-glycine 결합이 깨지면서 cysteine 포함체로 대사된다. 또한, 이 대사체는 N-acetyl-transferase 에 의해 acetyl-CoA 와 결합하여 N-acetylcysteine (mercapturic acid) 포함체로 변형되어 배설된다 (Lu 1999). 이러한 GSH 포함과정은 비가역적으로 GSH 을 소모하여, radical 의 비정상적인 증가는 GSH 를 고갈시키게 된다.

GSH 의 또 다른 주요 기능은 세포 내 산화/환원 균형을 유지하고 단백질의 thiol 기를 보호하는 것이다 (DeLeve and Kaplowitz 1991; Lu 1999). 단백질의 산화된 thiol 기는 GSH 에 의해 환원되고 GSH 는 GSSG 로 산화된다. 이러한 반응이 유지되기 위해서는 GSH/GSSG 의 비율이 유지되어야 하므로 이 비율은 세포내 산화/환원 정도를 나타내는 지표가 된다. 정상적인 경우 GSH/GSSG 의 비율은 10 이상이다 (Meredith and Reed 1982).

호흡의 결과로 정상적인 세포에서 항상 산화적 스트레스가 발생된다. Superoxide ($O_2^{\bullet-}$) 나 과산화수소의 발생은 그 자체로의 또는 hydroxyl radical 이나 peroxynitrite 생성을 통해 산화적 스트레스를 유발하게 되고 이러한 radical 들은 지질과산화물을 일으켜 세포막을 붕괴시키고 세포 손상을 야기한다. 세포 내에서 발생된 과산화수소는 GSH peroxidase (GPx) 의 촉매를 통해 GSH 에 의해 환원되고 GSH 는

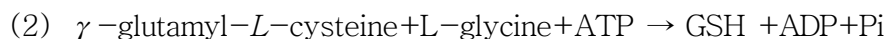
GSSG 로 산화된다. GSSG 는 다시 GSH reductase 에 의해 GSH 로 환원되어 redox cycle 을 형성하며, 이때 NADPH 가 산화된다. 또한, GPx 나 GST 는 GSH 를 사용하여 organic peroxide 들의 환원을 촉매하게 된다. 과산화수소는 catalase 에 의해 환원될 수 있지만, 이 효소는 peroxisome 내에만 존재하므로, mitochondria 에서는 GSH 가 매우 중요한 역할을 담당하게 된다 (DeLeve and Kaplowitz 1991; Fernandez-Checa et al., 1997). 과도하게 발생된 산화적 스트레스는 세포 내 GSSG 로부터 GSH 의 환원능력을 넘어서게 되고 세포는 redox state 를 유지시키고자 GSSG 를 방출시키거나 GSSG 가 단백질의 sulfhydryl 기와 결합하여 mixed disulfide 를 생성하게 된다. 그러므로 급격한 산화적 스트레스의 발생은 세포 내 GSH 을 고갈시킨다.

GSH 은 cysteine 을 공급하는 역할을 담당하기도 한다 (Lu 1999). Cysteine 은 세포 밖에서 매우 불안정하여 cystine 으로 빠르게 산화된다. GSH 는 carrier-mediated transporter 에 의해 세포 외부로 방출되고 세포 외부에 존재하는 GGT 에 의해 γ -glutamyl 기를 아미노산에게 전달하고 cysteinylglycine 으로 변환되며, γ -glutamyl amino acid 는 다시 세포 내부로 들어와 glutamate 를 공급하게 된다. Cysteinylglycine 은 세포 외부의 dipeptidase 에 의해 cysteine 및 glycine 으로 분해되는데 이 때 생성된 cysteine 은 세포 내부로 들어와 GSH 합성에 이용된다. 이러한 과정을 γ -glutamyl cycle 이라 부르며, 생성된 GSH 가 이것을 필요로 하는 세포에 공급된다는 보고가 있다 (Lu 1999).

4.2. Glutathione 의 합성

간은 GSH 농도가 가장 높을 뿐 아니라 GSH 합성에도 가장 중요한 역할을 담당하는 장기이다. 간은 transsulfuration 과정을 통해

methionine 으로부터 cysteine 을 생성하는 유일한 장기이다. 간세포 내 GSH 합성 속도는 혈액, 담즙, 그리고 mitochondria 로 이동하는 속도와 균형을 이루고 있다. 혈액 중에 존재하는 GSH 및 cysteine 은 대부분 간에서 유래한 것으로 간으로부터 혈액으로의 유출속도가 이 두 물질의 혈액 중 농도를 결정하게 된다 (Ookhtens and Kaplowitz 1998). GSH 은 전구체인 세 가지 아미노산 (glutamate, cysteine, glycine) 으로부터 모든 세포의 세포질에서 합성되며 ATP 를 필요로 하는 두 단계를 거쳐 생성된다 (DeLeve and Kaplowitz 1991).



GSH 합성의 첫 번째 단계는, 속도 결정 단계 효소인 glutamate cysteine ligase (GCL) 에 의해 이루어진다. GCL 은 heavy subunit (catalytic, GCLC, Mr ~ 73 kDa) 과 light subunit (modifier, GCLM, Mr ~ 31 kDa) 으로 이루어져 있는데, GCLC 가 효소활성을 나타내며 이것은 GSH 에 의해 되먹임 저해된다. GCLM 은 활성을 나타내지는 못하지만 glutamate 에 대한 GCL 의 Km 값을 낮추고 GSH 에 대한 Ki 값을 높여 활성을 조절하는 역할을 한다 (Huang et al., 1993). GCL 은 몇가지 요인에 의해 조절된다. GSH 는 non-allosteric 되먹임 저해로 glutamate 결합부위에 결합하여 GCL 활성을 억제하며, glutamate 와 경쟁적 관계에 있다 (Huang et al., 1988; Misra and Griffith 1998). 또한, GCL 에 의한 γ -glutamylcysteine 의 합성은 cysteine 가용능력에 의해 결정된다 (DeLeve and Kaplowitz 1991). Glutamate 와 cysteine 에 대한 GCL 의 Km 값은 각각 1.8 mM 그리

고 0.1 ~ 0.3 mM 인데, 세포 내 glutamate 의 농도는 K_m 값에 비해 10 배 이상 높은데 비해 cysteine 의 농도는 K_m 값 근처이다 (Lu et al., 1992; Misra and Griffith 1998). 따라서 cysteine 농도는 GSH 합성을 결정하게 된다.

그 다음 단계로는, GSH synthetase (GS) 에 의해 일어난다. GS 는 두 개의 동일한 subunit ($M_r \sim 118$ kDa) 으로 이루어져 있으며 (Oppenheimer et al., 1979), GSH 에 의해 되먹임 저해되지 않는다 (Lu 1999). GCL 에 의해 생성되는 γ -glutamylcysteine 은 매우 낮은 농도로 존재하므로, GS 활성 보다 GCL 활성이 GSH 합성의 속도를 결정하는 rate limiting enzyme 으로 알려져 있다. GS 의 과발현은 GSH 농도를 증가시키지 못하였지만, GCL 의 과발현은 GSH 의 농도를 증가시켰다 (Grant et al., 1997). 따라서 간 내 GCL 활성과 cysteine 농도는 GSH 농도를 조절하는 주요 결정인자들이다.

Cysteine 은 일반적으로 음식물 섭취 및 단백질 분해를 통해 공급되며, 간세포에서는 transsulfuration 과정을 통해 methionine 으로부터 생성되기도 한다. Cysteine 은 다른 아미노산들과 달리 -SH 기를 가지고 있기 때문에, 세포 안에서는 cysteine 으로 세포 밖에서는 disulfide 형태인 cystine 으로 존재한다. 따라서 간세포 내 cysteine 농도는 cysteine, cystine 그리고 methionine 의 유입과 함께 transsulfuration pathway 의 활성에 따라 조절된다. 음식 공급 중단은 GSH 농도를 현저히 감소시키며, 다시 음식을 공급한 몇 시간 안에 GSH 농도는 정상을 회복하게 된다 (Tateishi et al., 1974). Cysteine 은 alanine-serine-cysteine (ASC) system 과 Xc^- system 을 통해, 그리고 methionine 은 system L 을 통해 세포 내로 유입되기도 한다 (Bannai 1984; Kilberg 1982; Takada and Bannai 1984).

5. Polyamine

Polyamine 은 diamine 인 putrescine, cadaverine 과 oligoamine 인 spermidine, spermine 으로 존재하며 주로 원핵생물, 진핵생물에서 발견된다 (Tabor and Tabor 1984). 랫트의 폐에서는 다른 장기들 보다 비교적 적은 양인 putrescine 은 26 ~ 53, spermidine 은 450 ~ 880, spermine 은 292 ~ 460 nmol/g 으로 존재한다 (Elsayed et al., 1990; Seiler et al., 1990; Watanabe et al., 1993). Polyamine 은 양전하를 띄어 음전하와 결합력이 높다. 따라서 높은 친수성을 가지며 특히 DNA, RNA 와 같은 고분자와 강한 결합을 보여준다. 세포 생존에 필요한 기본적인 기능을 위한 polyamine 의 항상성 유지기전에 대해서 많은 실험을 통해 알려져 있다 (Pegg 2016). 첫째로 polyamine 의 합성과 대사를 담당하는 중요 효소들에 의해서 엄격하게 제어가 되고 있으며 둘째로 polyamine 의 합성을 억제시켰을 때 세포의 성장, 분화, 세포자멸 과 같은 기본적인 세포의 기능에 이상을 발견하였다. 셋째로 핵산, 단백질과 함께 polyamine 이 상호작용을 통하여 DNA 의 구조와 안정성에 영향을 준다 (Iacomino et al., 2012). 특히 호열성 세균에서 polyamine 이 DNA 의 안정성 유지에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다 (Terui et al., 2005). Polyamine 은 ribosome, tRNA, 특수한 mRNA 와도 물리적 결합을 통하여 단백질 합성에도 영향을 준다 (Igarashi and Kashiwagi 2010). 또한 세포 내 미소관에서는 polyamine 에 의해서 구조적 역할을 하는 단백질의 합성이 조절된다 (Ojeda-Lopez et al., 2014).

5.1. Polyamine 의 대사

포유류에서 체내 합성되는 polyamine 은 triamine spermidine, tetramine spermine, 그리고 전구체인 putrescine 이 있다 (Figure

4). 식이를 통하여 agmatine 과 같은 다른 polyamine 이 체내에서 발견될 수 있으나 생리학적으로 중요한 역할을 하지 않지만 천연 polyamine 은 생존에 꼭 필요하다고 알려져 있다. Polyamine 의 생합성 및 상호변환은 다음과 같다. Polyamine 은 arginine (또는 ornithine) 과 methionine 으로부터 만들어진다. Ornithine 은 argininase 를 통해 arginine 으로부터 합성되고, putrescine 은 ornithine decarboxylation 시키는 ornithine decarboxylase (ODC) 와 dcSAM 를 합성하는 S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) 를 통해서 합성된다. ODC 를 억제하거나 SAMDC 의 유전자를 억제했을 때 배아발달이 치명적으로 억제되었다 (Feng and Chiang 1984; Fozard et al., 1980; Pendeville et al., 2001). 이 ODC 와 SAMDC 는 polyamine 의 변화에 따라 다양한 측면에서 정밀하게 조절된다. dcSAM 이 공급될 때, aminopropyltransferase 인 spermidine synthase 와 spermine synthase 가 negative feedback 을 통해 polyamine 에 의해서 억제된다 (Pegg 2014; Pegg and Michael 2010). Aminopropyltransferase 는 비가역적이지만 spermine oxidase 에 의해 직접적으로 발생하는 산화적 분해 또는 spermidine/spermine-N1-acetyltransferase (SSAT) 을 통해 acetylation 이후 polyamine oxidase (PAO) 에 의해서 상호변환될 수 있다 (Battaglia et al., 2014; Pegg 2008). 특히 이 SSAT 는 polyamine 에 민감하며 polyamine 조절에 가장 중요한 역할을 한다 (Pegg 2008). 또 다른 polyamine 대사과정으로는 비교적 극성이 적고 다시 재변환 되지 않는 물질로 가는 방향이 있다. 이러한 terminal polyamine 은 diamine oxidase (DAO) 나 DAO-like copper-containing amine oxidase 에 의해서 발생한다 (Caron et al., 1988). 또한 transporter 를 통해서도 polyamine 의 양이 조절된다 (Khan et al., 1991; Seiler et al., 1996; Seiler and Dezeure 1990). 세포 성장과 분화 그리고 종양 성장에 있어서 polyamine 이 중요한 역할을 한다고 알려져 있기 때문에 polyamine 기전이 많이 연구되었다 (Janne

et al., 1978). 종양성 세포에서 발견되는 polyamine 대사 증가와 neoplastic 조직에서 polyamine 의 역할이 polyamine antimetabolite 인 α -difluoromethylornithine (DFMO) 나 종양 유발 물질인 methylglyoxal bis-(guanyldiazide) (MGBG) 를 사용한 실험에서 밝혀졌다.

하지만 polyamine 은 폐손상에 관련해서도 많은 연구가 진행되었다. 산화적 스트레스에 노출된 세포 모델과 제초제인 paraquat 의 폐독성 유발 모델에서 polyamine 관련 기전에 변화가 발생하였다. 그 이유는 확실히 밝혀져 있지 않지만 폐손상에 대해서 분명한 역할을 하는 것으로 보여진다 (Atkinson et al., 1987; Olson et al., 1989). 또한 polyamine 은 다양한 분야에서도 연구가 되고 있다. 최근에는 알러지 반응과 관련해서 polyamine 과 G protein 간의 관계에 대해서도 주목을 받고 있다. 특히 유아기 발달과정에 있어서 polyamine 의 필수성에 대해서도 연구가 되고 있다.

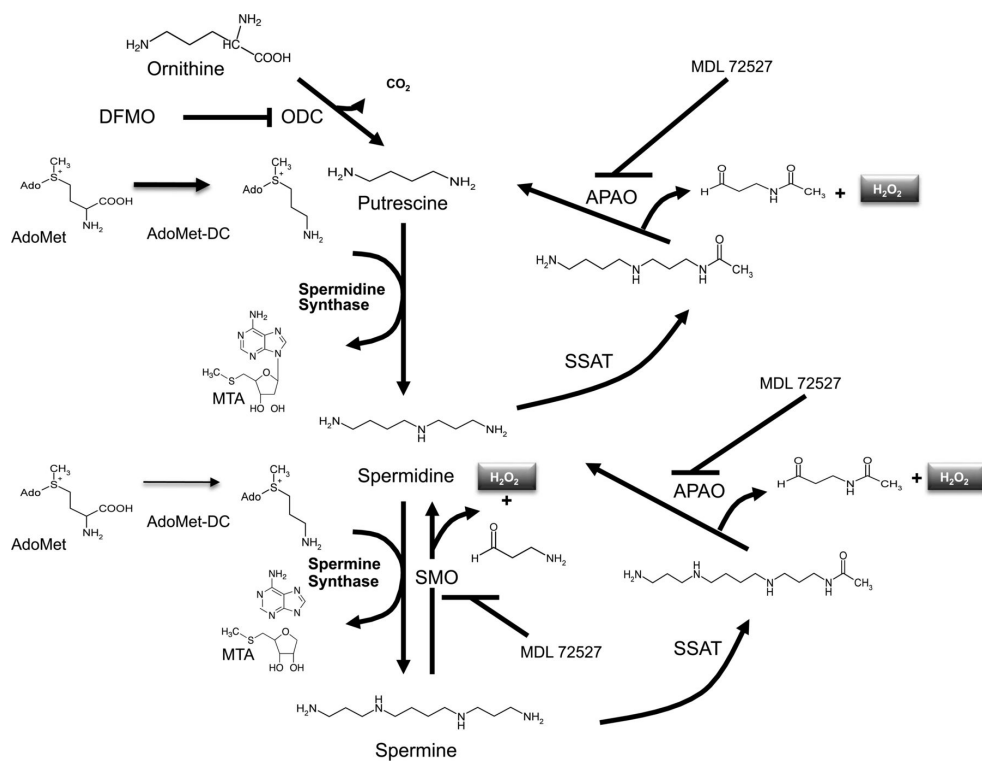


Figure 4. Polyamine structures, biosynthesis, and interconversion.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 시약 및 화학물질

Betaine, DL-homocysteine, 1,1-dimethylbiguanide (metformin), hydroxylamine, sodium bicarbonate, ethylene diamine tetra acid disodium salt (EDTA), sodium phosphate, Bradford reagent, Tween 20, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue, tetramethylethylenediamine (TEMED), boric acid, S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine iodide salt, ammonium phosphate, sodium acetate, glutathione, glutathione reductase, β -NADPH, methionine, cysteine sulfonate, hypotaurine, taurine, 1-heptane-sulfonic acid, ammonium phosphate monobasic, acetonitrile, tetrahydrofuran, trichloroacetic acid, 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F), bromophenol blue, naphthol blue black, 2-thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetraethoxy propane (TEPP or MDA), α -keto- γ -methiolbutyric acid (KMBA), diethylene triamine penta acetic acid (DTPA), ferrous ammonium sulfate, ethylenediamine tetraacetic acid, ascorbic acid, 3-morpholinopyrrolidine N-ethylcarbamide (SIN-1), 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), trans-4-hydroxy-L-proline, O-phthalaldehyde (OPA), Methyl viologen dichloride hydrate (paraquat), N-lauroylsacrosine sodium salt, citric acid, ninhydrin, putrescine

dihydrochloride, spermidine trihydrochloride, spermine tetrahydrochloride, hexamethylenediamine, dansyl chloride (Dns-Cl), sodium carbonate 는 Sigma chemical co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. 4-(dimethylamino) benzaldehyde 는 fluka (Milwaukee, WI, USA) 에서 구입하였다. 2, 2 '-azobisamidinopropane (ABAP) 은 Wako chemicals (Japan) 에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, Tris-acid, glycine 은 Amresco Inc (Cochran Road solon, OH, USA) 에서 구입하였다. Hydrogen chloride (HCl) 는 Daejung chemicals & Metals Co. (경기도 시흥시) 에서 구입하였다. Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, Ethanol, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), chloroform, sodium hydroxide, perchloric acid, formaldehyde, acetic acid 는 Dacsan Pure Chemical Co. (경기도 안산시) 에서 구입하였다. Isoflurane은 경보제약 (충청남도 아산시)에서 구입하였다. Skim milk, ammonium persulfate (APS), Bis/Acrylamide solution, amido black, bovine serum albumin (BSA), nitrocellulose, sodium dodecyl sulfate (SDS) 는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) 에서 구입하였다. ECL prime reagent, ECL plus reagent, Tris-base 는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용한 methanol 은 Burick and Jackson 사 (Muskegon, MI, USA) 에서 HPLC grade 제품을 구입하였다. 그 외 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

1.2. 항체

Anti-MATII, C β S, iNOS, NF- κ B, HO-1 polyclonal 항체

는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다. Anti-BHMT polyclonal 항체는 Everest Biotech (Oxfordshire, UK) 에서 구입하였다. Anti-GCL polyclonal 항체는 NeoMarkers, Inc (Fremont, CA, USA) 에서 구입하였다. β -actin 과 HuR polyclonal 항체는 Cell signaling Technology (Denver, CO, USA), Anti-CDO polyclonal 항체는 Yu Hosokawa 교수님 (Jissen Women's University, Tokyo, Japan) 으로부터 친절히 공여받았다. 모든 1 차 항체는 5 % 의 BSA 에 적당한 비율로 희석하여 사용하였으며, 사용 후 4 °C 에 보관하였다. 각 항체의 희석 비율은 각각 공급회사 에 기재되어 있는 reference 를 참고하였다.

2 차 항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit 은 Jackson Immuno Research (West Grove, PA, USA) 에서, donkey anti-mouse, donkey anti-goat 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다.

2. 동물실험모델

실험동물로 웅성 Spaque-Dawley (SD) 랫트 (7 주령, 243 ~ 272 g) 를 (주) 샘타코 (경기도 오산시) 에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전 1 주 동안 55 \pm 5 % 의 습도, 22 \pm 2 °C 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약학대학 141 동 동물실험 연구동에서 동물을 순응시켰으며 오전 7 시와 오후 7 시를 기준으로 12 시간 주기로 빛을 조절하였다.

Betaine 투여군은 랫트에게 betaine 을 1 % 의 농도로 음용수에 희석하여 매일 공급하였다. Paraquat 투여군은 betaine 또는 vehicle 공급을 시작한 2 주 뒤에 임의적으로 선택한 랫트를 isoflurane 을 통하여 흡입마취 시킨 후, paraquat 을 phosphate buffered saline

(PBS) 에 녹여 0.3 mg/500 μ l/kg 의 용량으로 외과적 수술 없이 직접 기관지를 통해 폐에 투여하였다. 대조군으로는 vehicle 만 투여하였다. Paraquat 투여 후 24시, 4일, 7일, 14일에 실험동물을 diethyl ether 로 마취 후 복강을 절개하여 복대동맥에서 혈액을 취하고 폐를 적출하였다.

3. 혈액 및 조직의 분획 분리

3.1. 혈장 및 혈청의 분리

헤파린을 처리한 syringe 를 사용하여 복대동맥에서 혈액을 채혈하였다. 혈장 분리를 위하여 15,000 rpm 에서 45 초간 원심분리한 상등액을 혈장으로 사용하였다. 혈청 분리를 위하여 헤파린 처리 하지 않은 1.5 ml EP tube 에 1.8 ml 정도의 혈액을 담고 30 분 이상 자연 응고 시킨다. 이후에 15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 에서 20 분간 원심분리한 상등액을 혈청으로 사용하였다. 혈장과 혈청 모두 -70° C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 보관하였다.

3.2. 폐의 실험 검체 준비

랫트를 diethyl ether 로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer (1.15 % KCl, 1 mM EDTA) 을 가하여 약 2 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후 4 $^{\circ}$ C, 10,000 g 에서

high speed centrifuge (Model J2-MC, Bechman Instruments Ins, Palo Alto, CA, USA) 로 20 분간 원심분리하고 상등액을 취하였으며 이 분획을 단백질 발현 및 대사체 측정에 사용하였다. 상등액은 실험시까지 -70°C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 보관하였다.

4. 폐손상 관련지표 측정

4.1. 4-hydroxyproline 의 함량 측정

랏트를 diethyl ether 로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 폐에 10 배 용량의 D.W. 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액을 사용하였다. PTFE-lined cap 이 있는 test tube 에 동량의 cHCl 을 넣고 마개를 닫아준다. 120°C 에서 5 시간 반응시켜 가수분해 하였다. 가수분해가 완료된 반응물에 활성탄을 5 mg 넣어 흡착시킨 이 후 13,000 g 로 2 분 동안 원심분리를 하였다. 맑아진 상등액을 옮겨 담아 증발시킨 후 동량의 D.W. 를 넣어 잘 섞어준다.

80 % citrate-acetate buffer pH 9.5 (5 % citric acid, 1.2 % glacial acetic acid, 7.25 % sodium acetate trihydrate, 3.5 % sodium hydroxide), 1.4 % chloramine-T, 10 % n-propanol, 0.6 % D.W.를 섞은 chloramine-T buffer $180\ \mu\text{l}$ 를 검체 $20\ \mu\text{l}$ 에 가하여 25 분 동안 상온에서 반응시켰다. 이 반응액에 n-propanol 과 perchloric acid 를 2:1 비율로 섞은 용액에 15 % p-dimethylamino benzaldehyde (DMAB) 를 녹인 Ehrlich' s reagent $200\ \mu\text{l}$ 를 가한 뒤, 65°C 에서 20 분 동안 반응시킨다. 반응액을 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyproline 을 동일한 방법으로 발색시킨 표준 검

량선으로부터 농도를 구하였다.

4.2. Proinflammatory cytokine 의 함량 측정

4.2.1. Serum cytokine (IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1) 의 함량 측정

헤파린을 처리한 syringe 를 사용하여 복대동맥에서 혈액을 채혈하였다. 헤파린 처리하지 않은 1.5 ml EP tube 에 1.8 ml 정도의 혈액을 담고 30 분 이상 자연응고 시킨다. 이후에 15,000 rpm, 4 °C에서 20 분간 원심분리한 혈청을 실험에 사용하였다. IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 의 양은 enzyme immunoassay technique 을 이용한 Duoset ELISA development Kits (R&D systems, MN, USA) 를 사용하여 측정하였다. 각각의 cytokine 함량 측정은 주어진 프로토콜에 의하여 진행되었다.

4.2.2. Tissue TNF- α 의 함량 측정

폐의 10 배 용량의 homogenization buffer (0.05% sodium azide, 0.5% triton X-100, protease inhibitor cocktail) 을 넣어 12,000 g 로 10 분 동안 polytron 으로 갈아서 상등액을 실험에 사용하였다. enzyme immunoassay technique 을 이용한 Duoset ELISA development Kits (R&D systems, MN, USA) 를 사용하여 주어진 프로토콜을 통해 측정하였다.

4.3. 림프구의 산화적 DNA 손상 측정

4.3.1. 림프구 분리

혈액으로부터 림프구의 분리는 lymphocyte separation medium (LSM) (MP biomedical, Ohio, USA) 을 사용하였다. 헤파린을 처리한 syringe 를 사용하여 복대동맥에서 채혈한 혈액 2 ml 를 PBS 2 ml 에 희석시킨 후 3 ml 의 LSM 이 담긴 15 ml tube 에 조심스럽게 옮긴다. 섞이지 않은 채로 상온에서 400 g 로 30 분 동안 원심 분리를 하였다.

4.3.2. Comet Assay

Alkaline comet assay 를 (Anderson et al., 1997; Faust et al., 2004) 이용하여 DNA damage 를 측정하였다. 준비된 lymphocytes 를 PBS 에 적정량 희석하였다. Low melting agarose (LMA) 로 만든 liquid gel 를 천천히 넣은 후 희석된 lymphocyte 와 거품이 생기지 않게 섞었다. 이 부유액 100 μ l 을 1 차 코팅된 slide glass 에 떨어뜨린 뒤 cover glass 로 덮어 18 분 동안 4 $^{\circ}$ C 에서 건조시켜 2 차 코팅을 하였다. Cover glass 를 벗겨낸 뒤 다시 cell 을 섞지 않은 liquid gel 을 떨어뜨려 새 cover glass 로 덮어 18 분 동안 4 $^{\circ}$ C 에서 건조시켜 3 차 코팅을 완료하였다. Cover glass 를 벗겨낸 slide glass 를 alkaline lysis solution (1.2 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 0.1 % Sodiumlauroylsarcosinate, 10 mM tris-base, 1 % tritonX-100, pH10) 에 1 시간 동안 4 $^{\circ}$ C 에서 위치시켰다. 전기영동 buffer (3 M NaOH, 2 mM Na₄EDTA, 2 % DMSO) 를 전기영동

챔버에 채우고 슬라이드를 20 분 동안 위치한 뒤 20 V, 300 mA 로 20 분간 전기영동을 실행하였다. 전기영동을 마치고 D.W. 에 4 °C 에서 10 분 동안 위치시켰다. Neutralization solution (0.4 M Tris, pH 7.4) 로 슬라이드를 중성화 시켰다. 100 % EtOH 에 40 분 동안 위치시킨 뒤 슬라이드를 건조시켜 -20 °C 에서 보관하였다. 슬라이드는 fluorescence system 이 장착된 fluorescence microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan) 으로 관찰하였으며 KOMET 5.5 (SETEC, Korea) 로 분석하였다. $M_{Olive} = (|CG - CG_H|) \times \frac{DNA}{100}$ 의 공식을 통하여 olive tail moment (OTM) 을 산출한다. CG 와 CG_H 는 각각 comet 구조 중 꼬리와 머리 부분의 중심점에서 DNA 밀도를 의미한다.

4.4. Total Oxyradical Scavenging Capacity (TOSC) assay

폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 뒤 15,000 rpm 으로 4 °C 에서 원심분리 하여 상층액을 사용하였다. 500 μ l 의 200 mM Pot. phosphate buffer (pH 7.4) 에 100 μ l 의 2 mM KMBA 를 혼합하여 실험에 사용한다. Peroxyl radical 은 100 μ l 의 sample 과 D.W. 를 첨가하여 total volume 인 1 ml 에 맞춘 뒤, 35 °C 의 조건에서 100 μ l 의 20 mM ABAP 를 첨가하여 반응시킨다. Hydroxyl radical 은 100 μ l 의 sample, 100 μ l 의 3 mM ascorbic acid, 100 μ l 의 60 μ M EDTA 와 D.W. 를 첨가하여 total volume 인 1 ml 에 맞춘 뒤, 35 °C 의 조건에서 100 μ l 의 30 μ M ferrous ammonium sulfate 를 첨가하여 반응시킨다. Peroxynitrite 는 100 μ l 의 sample, 100 μ l 의 1 mM DTPA 와 D.W. 를 첨가하여 total volume 인 1 ml 에 맞춘 뒤, 35 °C 의 조건에서 100 μ l 의 700 μ M SIN-1 을 첨가하여 반응시킨다. 생성된 ethylene을 정해진 time table 에 따라 1 ml gas syringe 로 일정양

취해 flame ionization detector 와 Porapack N coloum (Supelco, Bellefonte, PA) 이 설치된 gas chromatography 에 주입한다. 실험 측정치로부터 구한 그래프를 integration 하여 area under the kinetic curve (AUC) 를 얻고, $TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$ 의 공식을 통하여 산출한다. SA 와 CA 는 각각 sample 과 control 의 AUC 를 의미한다. TOSC 값은 control 조건에서 ethylene 생성 대비 억제 정도를 계산한 것이기 때문에 단위가 없다.

4.5. Histopathological examination

Haematoxylin-eosin staining (H&E) 은 포르말린 buffer (40 % formaldehyde 100 ml/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.52 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 16.38 g/L) 에 고정된 조직을 이용하여 파라핀 절편으로 만든 후 deparaffin, dexylene, 함수 과정을 거쳐 Harri' s hematoxylin solution 에 15 ~ 20 분간 반응시킨다. Harri 's hematoxylin 에서 꺼낸 후 과란색을 띄지 않을 때까지 세척한 뒤 1 % HCl-alcohol 에 2 ~ 3 회 반응 시킨다. 이후 0.5 % 암모니아수를 이용하여 청색화 하고 세척하였다. 세척 후 eosin solution 에 약 10 초간 반응시켜 염색하였으며 신속히 저농도에서 고농도의 알코올에서 dehydration 하였다. 이 염색을 통하여 병변 (폐혈, 출혈, 충혈, 화생) 이 발생한 정도를 0 ~ 3 까지 점수로 책정하여 계산하였다. Masson' s trichrome staining 은 포르말린에 고정된 조직을 이용하여 파라핀 절편으로 만든 후, trichrome stain kit (ScyTek Logan UT) 로 염색하여 섬유아세포의 분포와 콜라겐의 침착 정도를 통해 섬유화를 측정하였다. 진단 및 검경은 한국실험병리(주)를 통해 박재학 교수님께 의뢰하였다.

5. 황함유 아미노산과 관련 대사체의 측정

5.1. GSH 및 GSSG 측정

GSH 와 GSSG 는 enzymatic recycling method 를 이용하여 측정하였다 (Griffith 1980). 폐의 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액에 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO₄ 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 20,000 g 에서 10 분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 상등액에 phosphate 완충액(phosphate 0.125M, EDTA 6.3 mM, pH 7.5) 을 사용하여 GSH 농도가 표준 검량선의 농도 범위 내에 들도록 희석한 후 total GSH 정량을 위한 sample 로 사용하였다. 1.5 ml EP tube 에 0.3 mM NADPH 용액 700 μ l, 6 mM DTNB (5,5 dithio bis 2 nitrobenzoic acid) 용액 100 μ l, Sample 또는 GSH 표준액 200 μ l 을 가하여 잘 섞은 후 36 $^{\circ}$ C 에서 4 분간 반응시켰다. 여기에 GSH 측정을 위해 12.5 units/ml 농도의 GSH reductase 를 60 μ l 가하였다. 잘 섞은 후 UV/VIS spectrophotometer (model V-530, Jasco, Tokyo Japan) 을 이용하여 412 nm 에서 약 40 초간 흡광도의 변화를 측정하여 linear 한 45 초간의 기울기 변화를 구하고 표준 검량선으로부터 GSH 의 농도를 환산하였다.

5.2. Cysteine 함량 측정

Cysteine 함량은 GSH 의 함량을 측정하기 위해 분리한 시료를 사용하였다. Cysteine 함량 측정은 ninhydrin 의 반응물을 측정하는 방법으로 수행하였다 (Gaitonde 1967). 10 분간 100 $^{\circ}$ C 에서 100 μ l

의 산성 ninhydrin 용액 (6 ml acetic acid, 4 ml c-HCl, 250 mg ninhydrin), 100 μ l 의 acetic acid 와 100 μ l 의 시료를 반응시킨 후 즉시 얼음물로 식혔다. 95 % 에탄올 670 μ l 를 가하여 안정화 시키고 25분 후 560 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 농도의 계산은 표준 검량선으로부터 계산하였다.

5.3. SAM 및 SAH 함량 측정

폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액에 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO₄ 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 20,000 g 에서 10 분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 사용하였다. SAM 과 SAH 의 분석을 위해 1-heptanesulfonic acid sodium salt 를 사용하여 ion pairings 를 시키고 역상 column 과 UV 검출기(UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan) 를 장착한 HPLC system 을 이용하였다 (She et al., 1994). 이동상은 18 % methanol 을 함유하고 40 mM ammonium phosphate 와 8 mM 1-heptane-sulfonic acid sodium salt 로 구성되었으며 pH 3.0 으로 맞추고, column oven 을 이용하여 35 °C 에서 분석하였다.

5.4. Methionine, hypotaurine, taurine, ornithine 함량 측정

폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액에 methanol 을 1:3 의 비율로 잘 혼합한 후, 시료를 약 20,000 g 에서 10 분간 원심분리 하였다. Sample 의 저온 보관을 위하여 상등액을 증류수와 1:2 의 비율로 혼합하여 실험에 사용하였다.

정량을 위해 O-phthaldialdehyde (OPA) 을 이용하여 유도체화 하였는데, 시료 40 μ l 와 OPA 200 μ l 를 1.5 ml tube 에서 2 분간 반응시킨 후 역상 column 과 fluorometric 검출기 (FS-980 fluorescence detector, Applied Biosystem, Foster. CA, USA)를 장착한 HPLC 로 측정하였다. 0.1 M sodium acetic acid (solvent A; pH = 7.2) 와 methanol + tetrahydrofuran = 97 + 3 (v/v) (solvent B) 을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기 위해 2개의 pump (Jasco Model PU-980, Jasco Co. Tokyo, Japan) 를 이용하였다. 농도구배는 Rajendra 의 방법 (1987) 을 약간 변화시켜 solvent A 를 0 분에 90 %, 0 ~ 4 분에 84 %, 4 ~ 12 분에 84 %, 12 ~ 18 분에 78 %, 18 ~ 22 분에 78 %, 22 ~ 26 분에 70 %, 26 ~ 30 분에 70 %, 30 ~ 47 분에 53 %, 47 ~ 51 분에 53 %, 51 ~ 56 분에 30 %, 56 ~ 58 분에 0 %, 58 ~ 62 분에 0 %, 62 ~ 63 분에 90 % 로 변화 시켰으며 온도 40 $^{\circ}$ C 에 유속은 1.0 ml/min 으로 설정하였다. Methionine, hypotaurine, taurine, ornithine 의 표준 검량선으로부터 시료에 포함된 각각의 물질을 정량하였으며, 각각의 retention time 은 48, 32, 21, 58 분 이었다.

5.5. Homocysteine 함량 측정

폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액 200 μ l 와 200 μ l 의 10 mM dithiothreitol 를 혼합하여 시료에 포함된 homocysteine 및 protein 결합형 homocysteine 을 환원시키기 위해 실온에서 30 분간 반응시킨다. 이 용액과 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO₄ 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 20,000 g 에서 10 분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 상등액에 1.55 M NaOH 를 적당량 가해 pH 를 9.5 로 맞추고 7-Fluorobenzofuranzan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F)

를 첨가한 후, 차광된 상태에서 1 시간동안 60 °C 로 가열하여 반응시켜 유도체화 하였다. Symmetry C18 analytical column (4.6 x 150 nm, 3.5 μ m particles, Waters Co., Milford, MA, USA) 이 장착된 HPLC 를 사용하여 30 °C, 유속 0.8 ml/min 으로 용액 중 homocysteine 을 분리하였으며 형광의 세기를 fluorescence detector (Ex. 385 nm, Em. 515 nm) 로 측정하였다. 이동상은 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 을 A 로 methanol 을 B 로 사용하여 A 의 비율을 0 ~ 7 분에 100 %, 7 ~ 8 분에 25 %, 8 ~ 13 분에 25 %, 그리고 13 ~ 14.5 분까지 100 % 로 조정하였다. Homocysteine 을 사용하여 표준 검량선을 작성하고 시료 중의 농도를 구하였다.

5.6. Polyamines 함량 측정

폐에 4 배 용량의 homogenizing buffer 를 가하여 약 2 분 정도 분쇄한 분쇄액에 2 mM EDTA 가 함유된 1 M HClO₄ 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 20,000 g 에서 10 분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 정량을 위해 Dns-Cl 을 이용하여 유도체화 하였는데 시료 80 μ l, HDA 10 μ l, sodium carbonate 10 μ l, Dns-Cl 20 μ l 을 1.5 ml Ep tube 에서 50 °C, 30 분간 반응시켜 역상 column (μ bondapak C18) 과 fluorometric 검출기 (FS-980 fluorescence detector, applied Biosystem, Foster. CA, USA) 를 장착한 HPLC 로 측정하였다. Distilled water (solvent A) 와 methanol (solvent B) 을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기 위해 2 개의 pump (Jasco Model PU-980, Jasco Co. Tokyo, Japan) 를 이용하였다. 농도구배는 Fu, S. 의 방법 (1998) 을 약간 변화시켜 solvent A 를 0 분에 20 %, 0 ~ 11 분에 0 %, 11 ~ 12 분에 20 %, 12 ~ 14 분에 20 % 로 변화시켰으며 온도 40 °C 에 유속은 1.0 ml/min 으로 설정하여 분리하였으며, 형광의 세기를 fluorescence detector (Ex.

370 nm, Em. 506 nm) 로 측정하였다. Putrescine, spermidine, spermine 의 값에 inner standard 인 HDA 로 표준화된 값을 사용하여 표준 검량선을 작성하고 시료 중의 농도를 구하였다. Putrescine, HDA, spermidine, spermine 의 retention time 은 5.250, 5.854, 7.729, 10.079 분 이었다.

6. 단백질 발현 측정

Laemmli 의 방법 (1970) 에 따라 각 분획의 단백질을 sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 를 하였다. 7.5 % separating gel 을 제조하기 위해 3.95 ml 의 증류수, 2.5 ml 의 1.5 M Tris 완충액 (pH 8.8), 3 ml 의 30 % acrylamide/bis 용액, 즉시 조제한 10 % ammonium persulfate 60 μ l 와 고체화 시키기 위한 TEMED 5 μ l 를 가하여 미리 준비된 gel 굳힘용 유리판 사이에 붓고 그 위에 butanol 을 가하여 gel 표면을 고르게 한 후, 약 1 시간 가량 방치하여 굳혔다. 12 % separating gel 은 7.5 % 의 조성 중 증류수는 2.85 ml, 30 % acrylamide/bis 용액은 4 ml 로 변화시켜 만들었다. Separating gel 이 굳은 후 gel 표면의 증류수를 조심스럽게 제거하였으며, 다음의 조성에 따라 stacking gel 을 가한 후 comb 을 꽂아 sample loading 준비를 하였다. Stacking gel 은 3.36 ml 의 증류수, 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.5 ml, 30 % acrylamide/bis 용액 780 μ l, 10 % SDS 60 μ l, 10 % ammonium persulfate 45 μ l 와 TEMED 6 μ l 를 가해 완성하였다. 전기영동할 시료는 sample dilution buffer (1 M Tris (pH 6.8), 2.5 ml, 80 % glycerol 5 ml, 20 % SDS 5 ml, 1 % bromophenol blue 0.2 ml, β -mercaptoethanol 2 ml, D.W., 5.3 ml) 을 가하여 0.3 μ g/ μ l 로 표준화 하고, 95 $^{\circ}$ C 에서 5 분간 가열하여 준비하였다. 준비된 gel 에 시료를 loading 한 후 running buffer (1 L 의 용액 중에 tris-base

3.04 g, glycine 14.42 g, 20 % SDS 5 ml) 내에서 전기영동 하였다. 전압은 stacking gel 에서 100 volts 가 되도록 하고, separating gel 에서는 130 volts 를 유지하였다. 전기영동이 끝난 후 80 volts 에서 2 시간 동안 gel 을 nitrocellulose (NC) 지에 전이하였다. 이 때 사용한 transfer buffer 는 1 L 용액 중에 tris-base 3.04 g, glycine 14.42 g, 200 ml methanol 이 포함되었다. 전이가 끝난 NC 지는 단백질을 염색 시키는 amido black 용액을 이용해 전이과정이 정상적으로 이루어졌는지 확인하였으며, 5 % non-fat milk 용액에 담가 상온에서 1 시간 방치하여 비특이성 결합을 방지하고, 0.05 % Tween-20 을 함유한 tris buffer (TBST) 로 3 회 이상 세척한 후 1 차 항체를 사용하여 4 ℃ 에서 하룻밤 방치하였다. 1 차 항체는 5 % bovine serum albumin 용액에 희석하였다. 다음날 5 % non-fat milk 용액으로 희석한 2 차 항체로 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescence system (Amershan, Gaithersburg, MA, USA) 을 사용하여 발색하였다.

결 과

Part I. 랫트의 폐에서 시간대별 paraquat 의 영향

Paraquat 은 0.3 mg/ 500 μ l/kg 의 농도로 PBS 에 녹여 직접 기도를 통해 단일투여 하였으며, 동일한 양의 생리식염수를 투여하여 sham 군을 설정하였다. Paraquat 투여 후 각각 24 시간, 1주, 2주에서 랫트를 sacrifice 하였다.

1. Paraquat 투여로 유발된 폐의 무게 변화

몸무게는 paraquat 투여에 의해 337 ± 8 g 에서 24 시간 뒤에 325 ± 4 g 으로 변화는 없었다. 하지만 1 주 이후부터 261 ± 8 g, 2 주 시간대에서는 261 ± 19 g 으로 유의적으로 감소하였다. 폐무게는 0 시 시간대의 1.3 ± 0.1 g 에서 24 시 시간대에서는 2.1 ± 0.1 g, 1 주 시간대에는 2.3 ± 0.2 g, 2 주 시간대에는 2.3 ± 0.1 g 으로 유의적으로 증가하였다. 이러한 변화에 의한 폐와 몸무게 비율의 백분율은 0.38 ± 0.02 g % 에서 24 시간 뒤에 0.65 ± 0.04 % 로 유의적인 증가가 시작되었고 이러한 변화는 1 주 이후부터 0.90 ± 0.09 %, 2 주 시간대에서는 0.89 ± 0.08 % 로 유의적으로 더 증가하였다 (Figure 5, 6, 7).

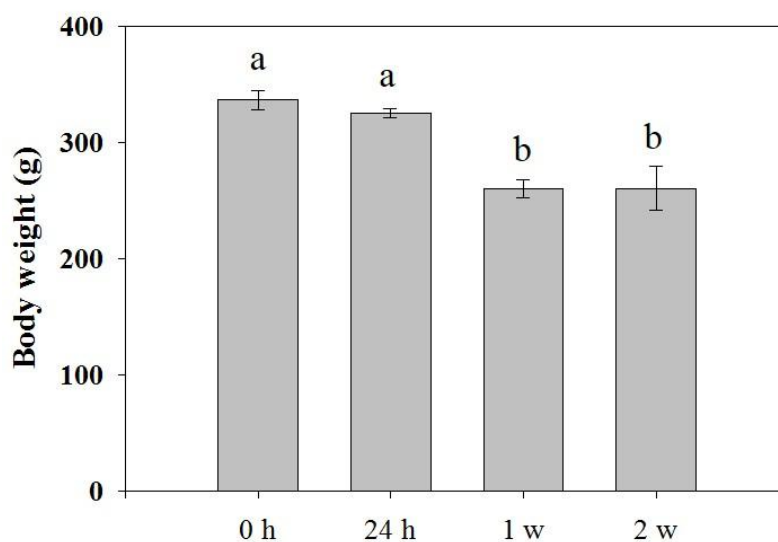


Figure 5. Body weight changes after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.001$).

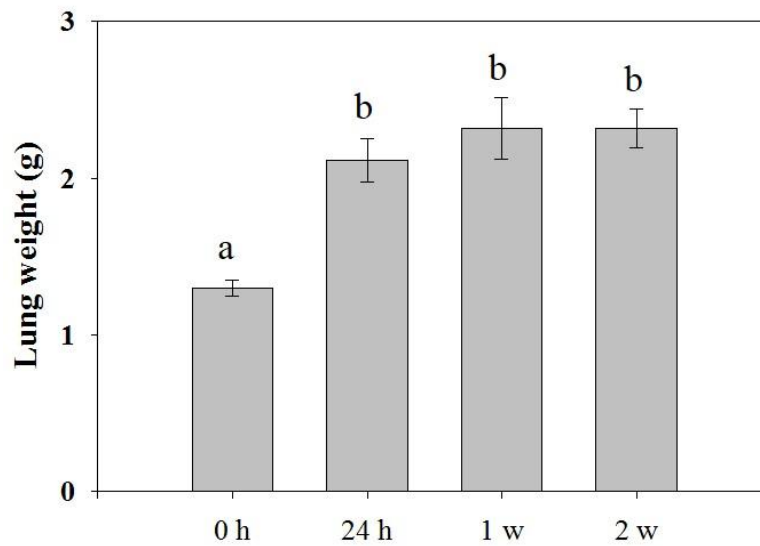


Figure 6. Lung weight changes after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.001$).

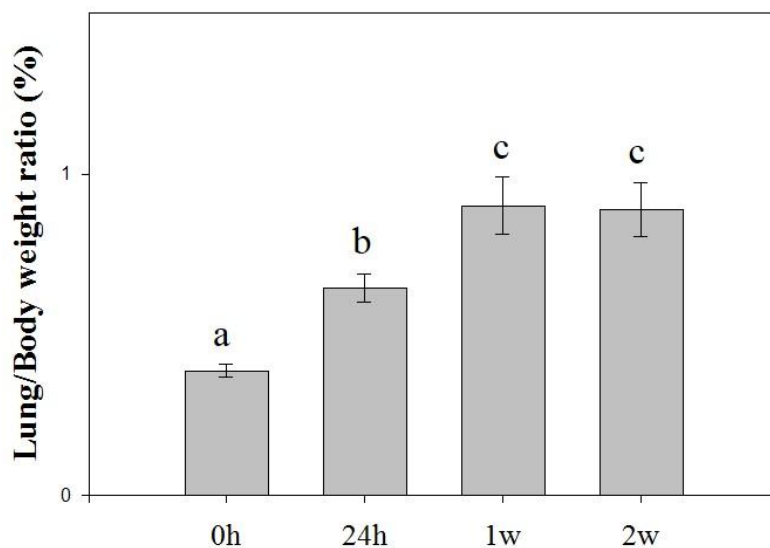


Figure 7. Lung/Body weight ratio changes after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.001$).

2. Paraquat 투여로 유발시킨 폐 병변 및 섬유화 변화

폐섬유화의 정도를 염색법을 통하여 측정하기 위하여 우측 폐의 절편을 haematoxylin-eosin (H&E) 과 masson' s trichrome 법으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. H&E 로 염색하여 판독한 결과를 통해 시간의 흐름에 따라 병변 증가를 확인하였다. 또한 섬유화 정도를 확인하기 위하여 섬유아세포와 콜라겐 등을 선택적으로 염색하기 위해 masson' s trichrome stain 을 수행하였다. Paraquat 투여에 의해 24 시 시간대에서는 정상수준의 림프구 응집이 보였지만 초기단계의 염증세포 침윤과 부종이 발견되었다. 1 주 시간대에서는 폐포벽의 결합조직이 증가하여 벽이 두꺼워지고 허파부분은 염증세포, 결합조직 및 삼출물로 충전되어 부종이 관찰되었다. 세기관지에서는 표피세포 과형성이 관찰되었다. 2 주 시간대 에서는 전체적인 병변이 심각해지고 섬유화가 발생한 면적의 평균이 유의적으로 증가하였다 (Figure 8). 섬유화 지표인 4-hydroxyproline 은 0 시 시간대의 136.7 ± 11.7 nmol/mg protein 에서 paraquat 에 의해 24 시 시간대에서 61.8 ± 7.8 nmol/mg protein 으로 유의적인 감소를 하였지만 1 주 시간대에서 200.4 ± 16.6 nmol/mg protien 으로 유의적인 증가를 하였다 (Figure 9).

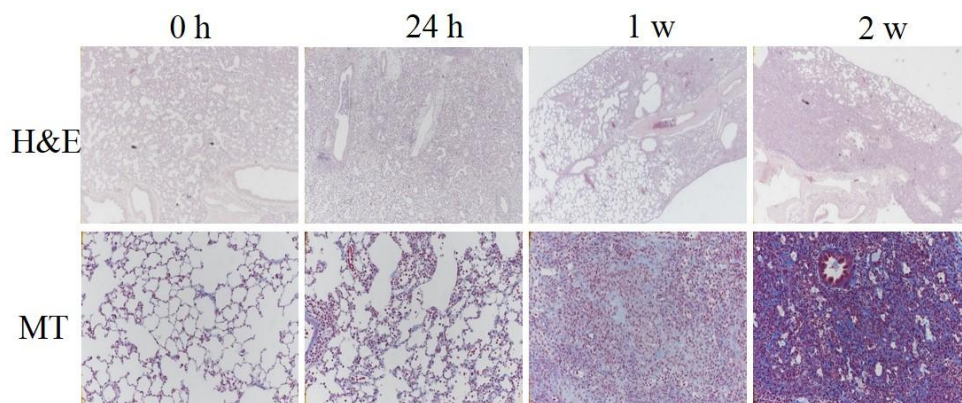


Figure 8. Histopathological changes in the lung rats after PQ instillation (H&E, MT). H&E; Haematoxylin & eosin staining, MT; Masson' s trichome staining.

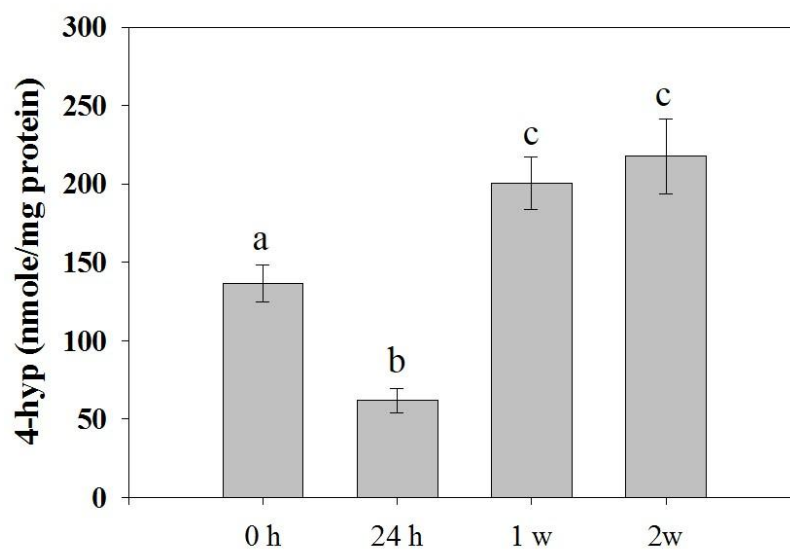


Figure 9. Level of 4-hydroxyproline in the lung rats after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$).

3. Paraquat 투여로 유발된 산화적 스트레스 변화

범용적인 산화적 스트레스 지표로써 림프구의 DNA 손상정도를 comet assay 로 측정하였다. 손상정도를 객관적 기준에 의해 수치화 시킨 OTM 으로 계산하여 확인하였다 (Figure 10). Paraquat 투여에 의해 림프구의 DNA damage 가 24 시 시간대에서 증가하는 경향을 보이나 유의적이진 않다. 하지만 1 주 시간대 이후부터는 유의적으로 DNA damage 가 증가하였다.

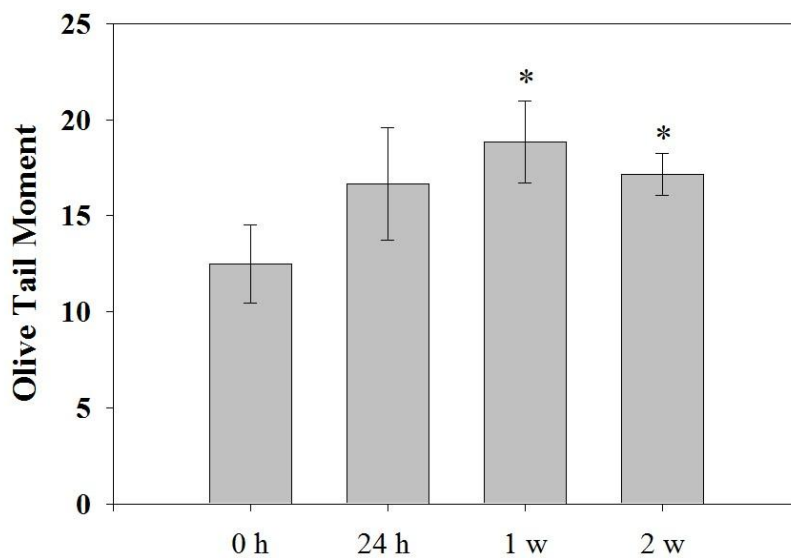
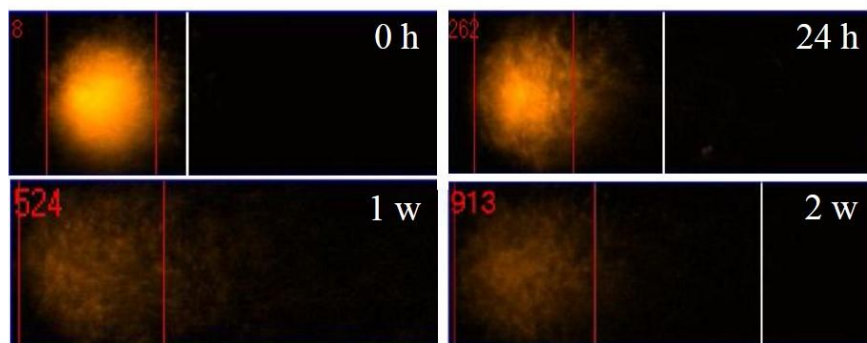


Figure 10. Oxidative DNA damage changes in lymphocyte after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. *Singnificantly different from the 0 h, $P < 0.05$.

4. Paraquat 투여에 의해 유발된 폐의 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화

폐 내 methionine 은 0 시 시간대의 1.23 ± 0.08 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여 2 주 후에 0.87 ± 0.03 nmole/mg protein 로 유의적인 감소가 발생하였다. SAM 은 0 시 시간대의 0.16 ± 0.01 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대에서는 0.20 ± 0.01 nmole/mg protein 로 증가하는 경향을, 1 주 시간대에서는 0.22 ± 0.02 nmole/mg protein 로 유의적인 증가를 보였으나 2 주 시간대에서 0.17 ± 0.02 nmole/mg protein 로 다시 감소하는 경향을 보였다. SAH 는 SAM 의 시간대 농도변화와 비슷한 경향을 보였지만 모든 시간대에서 유의적인 변화는 발생하지 않았다. Homocysteine 은 0 시 시간대의 0.43 ± 0.03 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대의 0.14 ± 0.02 nmole/mg protein 로 급격한 감소 이후 1 주 와 2 주 시간대에서는 각각 0.34 ± 0.03 , 0.34 ± 0.02 nmole/mg protein 로 유의적인 증가가 확인 되었지만 0 시 시간대의 농도보다는 낮은 수준을 유지하였다. Cysteine 은 0 시 시간대의 1.18 ± 0.13 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대에서 1.98 ± 0.13 nmole/mg protein 으로 유의적으로 증가하였고 1 주 시간대에서 3.55 ± 0.40 nmole/mg protein 으로 가장 농도가 높아졌다. 2 주 시간대의 농도는 $2.62 \pm$ nmole/mg protein 으로 1 주 시간대 보다 유의적으로 감소하였지만 0 시, 24 시 시간대 보다 농도가 높다. GSH 은 0 시 시간대의 15.22 ± 1.08 nmole/mg protein 에서 1 주 시간대의 27.17 ± 2.37 nmole/mg protein 로 유의적인 증가를 보였지만 2 주 시간대에서 17.14 ± 2.11 nmole/mg protein 으로 다시 감소하는 경향을 보였다. Hypotaurine 은 0 시 시간대의 2.43 ± 0.48 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대에서 1.54 ± 0.17 nmole/mg protein 로 감소하는 경향을 보였고, 1 주 시간대에서 3.51 ± 0.41 nmole/mg protein 로 24 시 시간대 보다 높아졌다. 2 주 시간대에서는 1.68 ± 0.44 nmole/mg protein 로 1 주

시간대의 농도보다 낮아졌다. Taurine 은 control 의 67.71 ± 2.24 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대의 38.65 ± 3.37 nmole/mg protein 으로 감소하였고, 1 주 시간대에서 72.41 ± 16.81 nmole/mg protein 으로 다시 증가하였다. 2 주 시간대에서는 24 시 시간대의 농도에 비해 88.74 ± 9.88 nmole/mg protein 으로 증가하였으나, 0 시 시간대의 농도와는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Ornithine 은 0 시 시간대의 3.91 ± 0.06 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대의 7.88 ± 1.90 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보이며, 1 주 시간대에서 10.13 ± 3.02 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였지만 2 주 시간대에서는 6.11 ± 1.17 nmole/mg protein 으로 다시 감소하는 경향을 보인다. Putrescine 은 0 시 시간대의 0.63 ± 0.09 nmole/mg protein 에서 24 시 시간대의 0.80 ± 0.32 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보이고, 1시 시간대에서 1.67 ± 0.27 nmole/mg protein 으로 다시 유의적인 증가를 보인다. 2 주 시간대에서는 1.27 ± 0.43 nmole/mg protein 로 다시 감소하는 경향을 보인다. Spermidine 과 spermine 모두 paraquat 에 의한 변화가 없었다 (Table 1).

Table 1. Changes of sulfur containing amino acid and related substance in the lung of rats after PQ instillation

(nmole/mg protein)	0hr	24hr	1w	2w
Methionine	1.23±0.08 ^{ab}	1.39±0.15 ^a	1.29±0.18 ^a	0.87±0.03 ^b
SAM	0.16±0.01 ^a	0.20±0.01 ^{ab}	0.22±0.02 ^b	0.17±0.02 ^{ab}
SAH	0.09±0.03	0.11±0.02	0.14±0.04	0.10±0.02
Homocysteine	0.43±0.03 ^a	0.14±0.02 ^b	0.34±0.03 ^c	0.34±0.02 ^c
Cysteine	1.18±0.13 ^a	1.98±0.13 ^b	3.55±0.40 ^c	2.62±0.19 ^d
GSH	15.22±1.08 ^a	13.90±2.43 ^a	27.17±2.37 ^b	17.14±2.11 ^{ab}
Hypotaurine	2.43±0.48 ^{ab}	1.54±0.17 ^a	3.51±0.41 ^b	1.68±0.44 ^a
Taurine	67.71±2.24 ^{ab}	38.65±3.37 ^a	72.41±16.81 ^{ab}	88.74±9.88 ^b
Ornithine	3.91±0.06 ^a	7.88±1.90 ^{ab}	10.13±3.02 ^b	6.11±1.17 ^{ab}
Putrescine	0.63±0.09 ^a	0.80±0.32 ^{ab}	1.67±0.27 ^b	1.27±0.43 ^{ab}
Spermidine	7.95±1.26	8.11±0.61	8.48±1.38	9.31±1.19
Spermine	5.08±0.62	6.86±1.76	4.07±0.30	3.80±0.70

Each value represents the mean±SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c, d) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, P<0.05).

5. Paraquat 에 의해 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화

황함유 아미노산 대사를 매개하는 대표적인 효소들의 단백질 양을 western blotting 을 통하여 확인하였다 (Figure 11). MAT II 는 기질인 methionine 변화와 비슷하게 발현을 하였지만 유의적인 변화는 발견되지 않았다. CBS 는 paraquat 를 투여한지 24 시 시간대에서만 유의적인 증가를 보였다. CDO 는 paraquat 투여한지 24 시 시간대에서는 변화가 없었지만 1 주, 2 주 시간대에서는 유의적인 감소가 확인되었다. GSH 합성에 가장 중요한 역할을 하는 GCLC 는 paraquat 투여에 의해 변화가 발견되지 않았다.

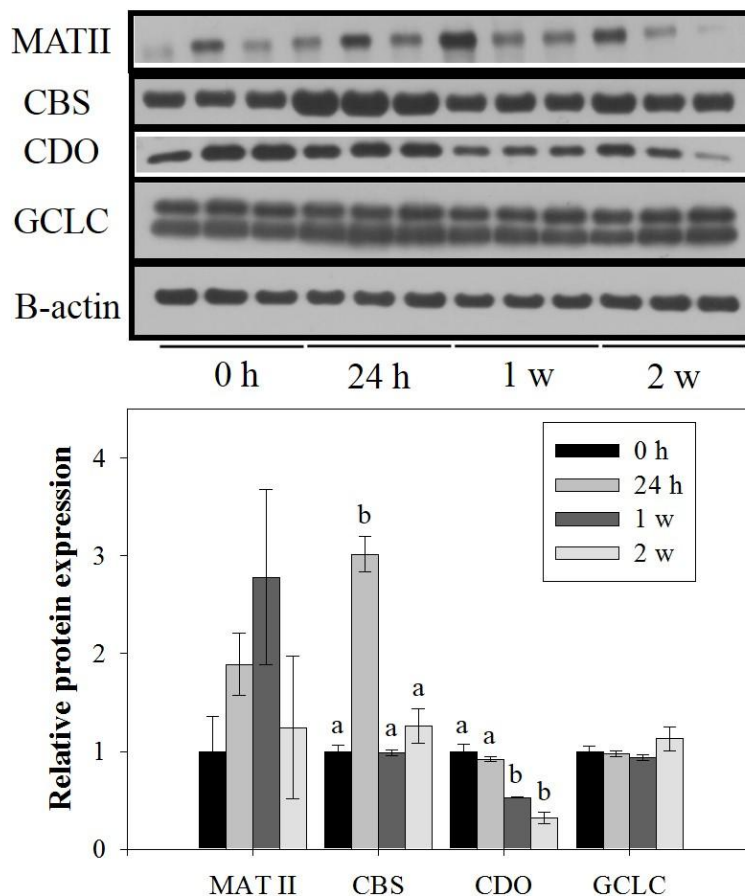


Figure 11. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism in the lung of rats after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation; L, Liver. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

Part II. Paraquat 으로 유발시킨 폐손상에 대한 betaine 의 효과

Paraquat 은 0.3 mg/ 500 μ l/kg 의 농도로 PBS 에 녹여 직접 기도를 통해 단일투여를 하였으며, 동일한 양의 PBS 를 투여하여 sham 군을 설정하였다. 임의로 설정한 betaine 투여군은 PBS 또는 paraquat 를 투여하기 2 주 전부터 betaine 를 음용수에 1 %의 농도로 희석하여 식수로 매일 제공하였다. Paraquat 단일투여 후 각각 4 일과 14 일에 랫트를 sacrifice 하였다.

1. Paraquat 투여 4 일 후, 유도된 몸무게와 폐무게 변화에 대한 betaine 의 효과

Paraquat 투여에 의해 몸무게는 control 군의 361 ± 8 g 에서 265 ± 3 g 으로 감소되었고, 폐무게는 1.4 ± 0.1 g 에서 2.7 ± 0.1 g 으로 현저한 증가가 발생하였다. 이러한 변화에 의한 몸무게 대비 폐무게의 백분율은 control 군의 0.40 ± 0.02 % 에서 1.054 ± 0.04 % 로 급격한 증가가 발생하였다. 이러한 변화는 betaine 1 % 투여군에서 각각 264 ± 8 g, 2.65 ± 0.2 g 으로 변화가 발생하지 않았고, 몸무게 대비 폐무게의 백분율 역시 1.01 ± 0.11 % 로 paraquat 투여군과 차이가 없었다 (Figure 12, 13, 14).

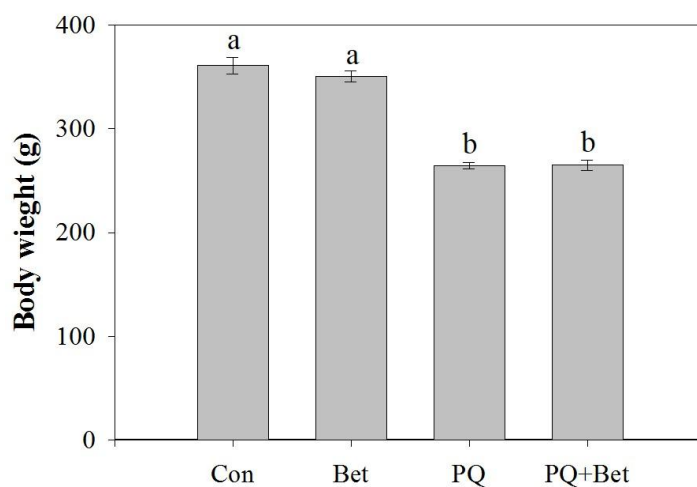


Figure 12. Body weight at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$). Con, control rats; Bet, rats supplemented with betaine; PQ, PQ-instilled rats; PQ+Bet, rats supplemented with betaine before PQ instillation.

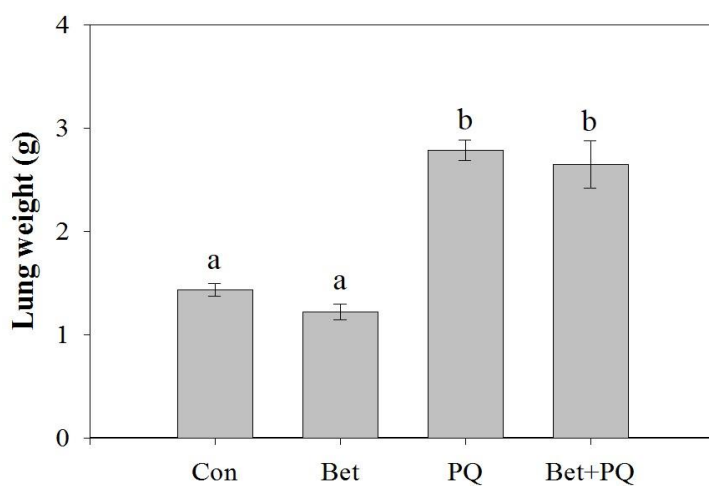


Figure 13. Lung weight at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$). Con, control rats; Bet, rats supplemented with betaine; PQ, PQ-instilled rats; PQ+Bet, rats supplemented with betaine before PQ instillation.

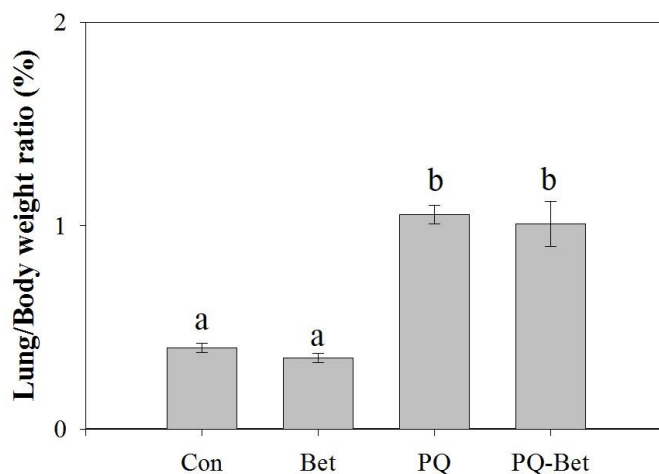


Figure 14. Lung/body weight ratio at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$). Con, control rats; Bet, rats supplemented with betaine; PQ, PQ-instilled rats; PQ+Bet, rats supplemented with betaine before PQ instillation.

2. Paraquat 투여 2 주 후, 유도된 몸무게와 폐무게 변화에 대한 betaine 의 효과

Paraquat 투여에 의해 몸무게는 control 군의 411 ± 11 g에서 289 ± 22 g 으로 현저하게 감소되었고, 폐무게는 1.5 ± 0.1 g 에서 2.1 ± 6.5 g 으로 증가가 시작되었다. 이러한 변화에 의한 몸무게 대비 폐무게의 백분율은 control 군의 0.35 ± 0.01 % 에서 0.75 ± 0.08 % 로 급격한 증가가 발생하였다. 이러한 변화는 betaine 1 % 의 투여에 의해서 몸무게는 369 ± 8 g 으로 유의적인 증가를 하였고 폐무게는 2.3 ± 0.1 g 으로 변화가 없었다. 하지만 몸무게 대비 폐무게의 백분율은 0.59 ± 0.03 % 로 유의적인 감소를 보였다 (Figure 15, 16, 17).

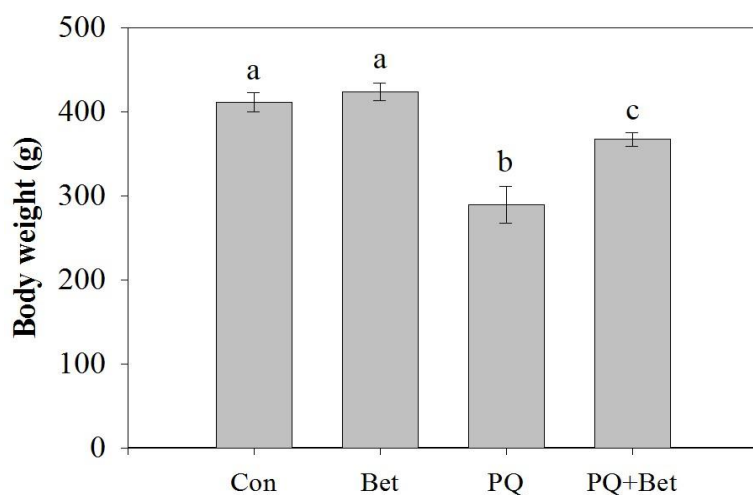


Figure 15. Body weight at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. on, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$).

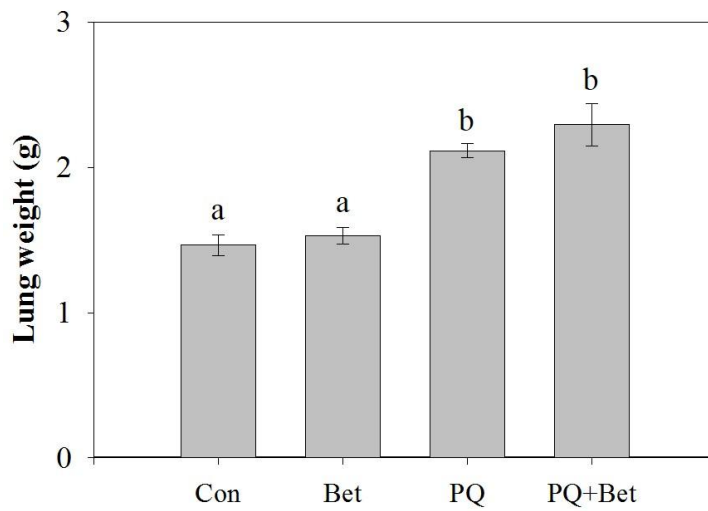


Figure 16. Lung weight at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. on, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

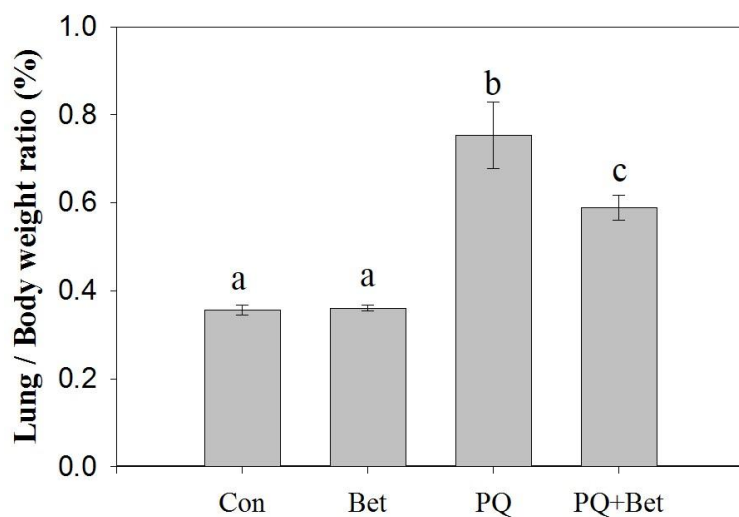


Figure 17. Lung/body weight ratio at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. on, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$).

3. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 병변 및 섬유화에 대한 betaine 의 영향

Paraquat 투여 후 폐섬유화의 진행정도를 측정하기 위하여 폐의 절편을 haematoxylin-eosin (H&E) 과 masson' s trichrome 법으로 염색하여 검경하였고, 섬유화 지표로서 pro-fibrotic cytokine 인 serum TGF- β 를 측정하였다.

관독한 결과 sham 군, betaine 군에서 병변이 관찰되지 않았지만 paraquat 투여군에서는 폐포강과 간질에 단핵구, 대식구, 호중구가 침윤이 관찰되었고, 폐포강내에 호염성의 세포성분을 가진 초자양막이 발견되었다. Paraquat, betaine 병용투여군에서는 폐포벽은 비후되었으나, 폐포강내에 염증세포는 관찰되지 않았다. 섬유아세포와 콜라겐 등을 선택적으로 염색하는 masson' s trichrome stain 을 사용하여 폐섬유화 정도를 측정하였다. Control 군 과 betaine 투여군에서는 airway 및 alveolar septa 가 정상범위의 두께를 유지하고 있었지만 paraquat 투여군과 paraquat, betaine 병용투여군에서는 콜라겐 함량 증가와 더불어 섬유화 증가를 확인하였다 (Figure 18, 19). 폐포와 세기관지에서 각 병변들의 심각성 정도를 수치화 했을 때, paraquat 투여에 의해 섬유화, 초자막, 부종, 출혈, 화생이 증가하였고, betaine 투여에 의해 초자막 형성이 억제되었다 (Table 2). 또한 혈중 TGF- β 1 은 control 군의 2962 ± 123 pg/ml 에서 paraquat 투여에 의해 6179 ± 126 pg/ml 로 유의적인 증가를 보였다 이러한 변화는 betaine 투여에 의해 4085 ± 732 pg/ml 로 감소하는 경향을 보였다 (Figure 20).

Haematoxylin & eosin

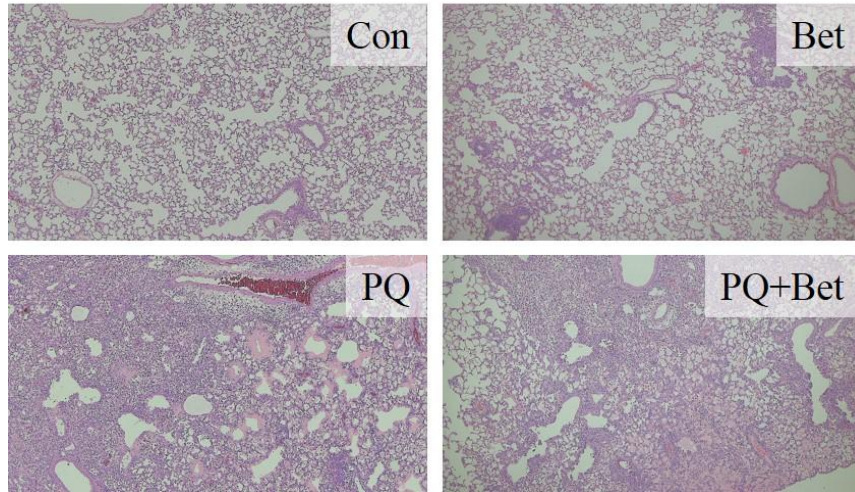


Figure 18. Histopathological changes in the lung rats at 4 day after PQ instillation (H&E). Haematoxylin & eosin staining. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

Masson's trichome staining

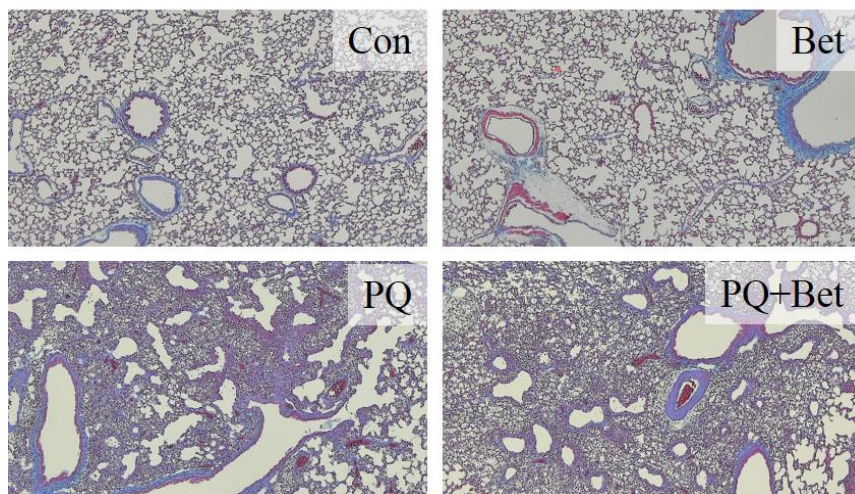


Figure 19. Histopathological changes in the lung rats at 4 day after PQ instillation (MT). Masson' s trichome staining. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

Table 2. Score of severity in lung lesions (4 day).

		Con	Bet	PQ	PQ+Bet
Alveoli	Fibrosis	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0
	Hyaline membrane	0	0	0.5±0.0	0
	Edema	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0
	Congestion	0	0	0	0
	Hemorrhage	0.3±0.3	0.3±0.3	2.0±0.0	2.0±0.0
	Metaplaia	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0
Bronchioles	Fibrosis	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0
	Edema	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0
	Congestion	0	0	0	0
	Hemorrhage	0	0	0	0
	Metaplaia	0	0	3.0±0.0	3.0±0.0

Severity of each lesion was scored on a scale of 0 to 3 (0: none, 1: minimal, 2: moderate, 3: marked). Each value represents the mean±SEM for 3 or 4 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

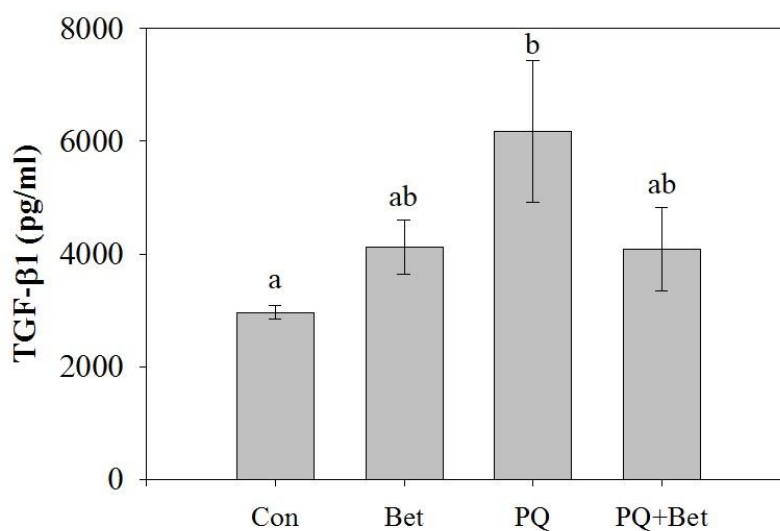


Figure 20. Serum TGF- β 1 levels at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, P<0.05).

4. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 병변 및 섬유화에 대한 betaine 의 영향

Paraquat 투여 후 폐섬유화의 진행정도를 측정하기 위하여 폐의 절편을 haematoxylin-eosin (H&E) 과 masson' s trichrome 법으로 염색하여 검경하였고, 섬유화 지표로서 pro-fibrotic cytokine 인 serum TGF- β 1 과 콜라겐의 구성요소인 4-hydroxyproline 을 측정하였다.

Control 군, betaine 군에서는 병변이 관찰되지 않았지만 paraquat 투여에 의해 폐포강과 간질에 단핵구, 대식구, 호중구의 침윤 뿐만 아니라 거핵 다세포 및 폐포강내에 호염성의 세포가 관찰되었고, 세포벽 또한 비후되었다. Paraquat 과 betaine 병용투여군에서는 폐포강내에 단핵구, 대식구, 호중구의 침윤이 관찰되었지만 전체적으로 증상이 완화되었고 paraquat 에 의해서 비후된 세포벽 역시 완화되었다 (Figure 21). Masson' s trichrome staining 을 통하여 콜라겐을 분포 정도를 확인한 결과 paraquat 에 의한 증가가 betaine 투여에 의해 완화되었음을 확인하였다 (Figure 22). 또한 폐포와 세기관지에서 각 병변들의 심각성 정도를 수치화 했을 때, paraquat 투여에 의해 섬유화, 부종, 출혈, 화생이 현저하게 증가하였고 betaine 투여에 의해 모두 완화되었다 (Table 3). 콜라겐의 구성요소 중 하나인 4-hydroxyproline 은 control 의 123.35 ± 12.71 nmole/mg protein 에서 paraquat 에 의해 177.89 ± 7.27 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 하였으나 betaine 투여에 의해 97.00 ± 23.94 nmole/mg protein 로 현저히 완화되었고, 혈중 TGF- β 1 은 control 의 3905 ± 566 pg/ml 에서 paraquat 투여에 의해 6772 ± 294 pg/ml 로 증가하였고 betaine 에 의해 4702 ± 436 pg/ml 로 유의적으로 감소하였다 (Figure 23, Figure 24).

Haematoxylin & eosin

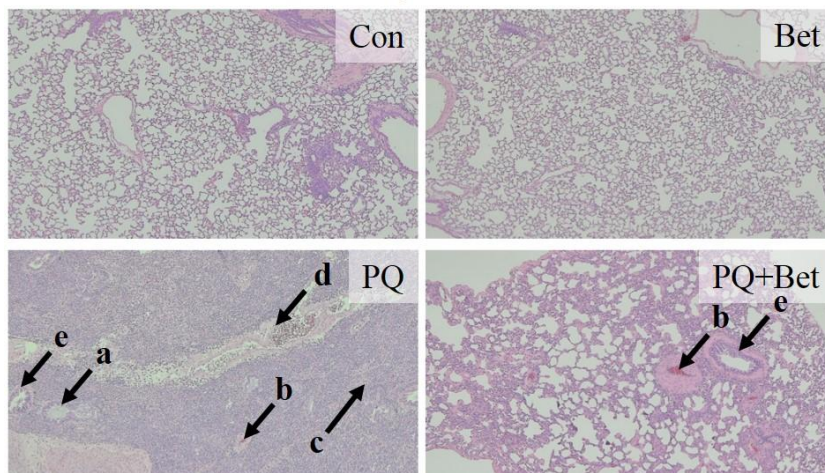


Figure 21. Histopathological changes in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. H&E staining (x40). Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. a: edema, b: thickened wall, c: hemorrhage, d: infiltrated cells, e: metaplasia. rats fed betaine before PQ instillation.

Masson's trichrome staining

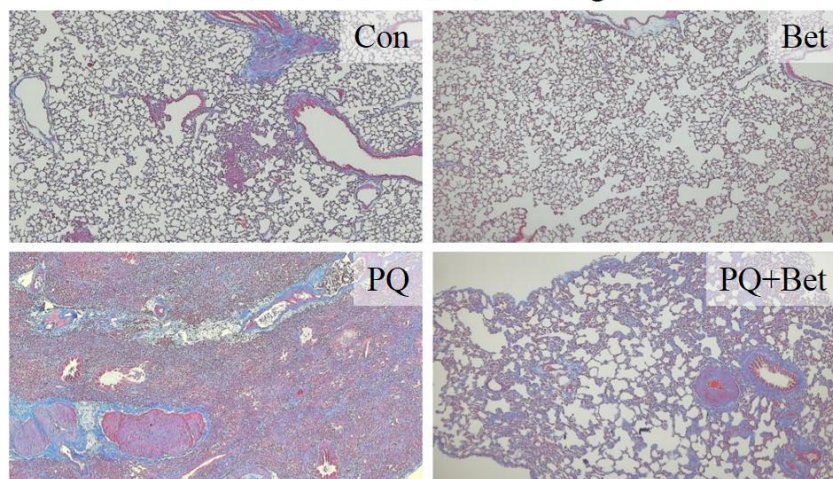


Figure 22. Histopathological changes in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Masson' s trichrome staining (x40). Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

Table 3. Score of severity in lung lesions (2 wk).

		Con	Bet	PQ	PQ+Bet
Alveoli	Fibrosis	0	0	3.0±0.0	1.5±0.9
	Edema	0	0	3.0±0.0	0.8±0.8
	Congestion	0	0	0	0
	Hemorrhage	0.7±0.3	0	2.0±0.0	0.5±0.5
	Metaplaia	0	0	3.0±0.0	1.0±0.7
Bronchioles	Fibrosis	0	0	3.0±0.0	0.8±0.8
	Edema	0	0	3.0±0.0	0.8±0.8
	Congestion	0	0	0	0
	Hemorrhage	0	0	0	0
	Metaplaia	0	0	3.0±0.0	1.5±0.9

Severity of each lesion was scored on a scale of 0 to 3 (0: none, 1: minimal, 2: moderate, 3: marked). Each value represents the mean±SEM for 3 or 4 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

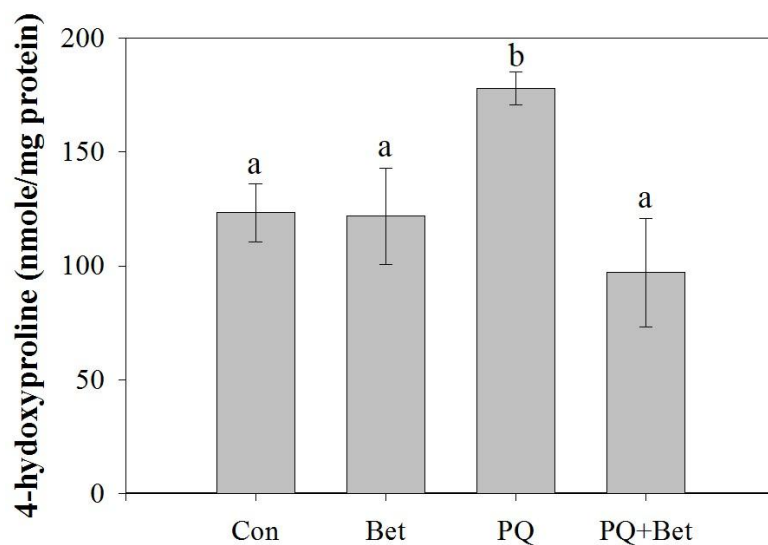


Figure 23. 4-hydroxyproline in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

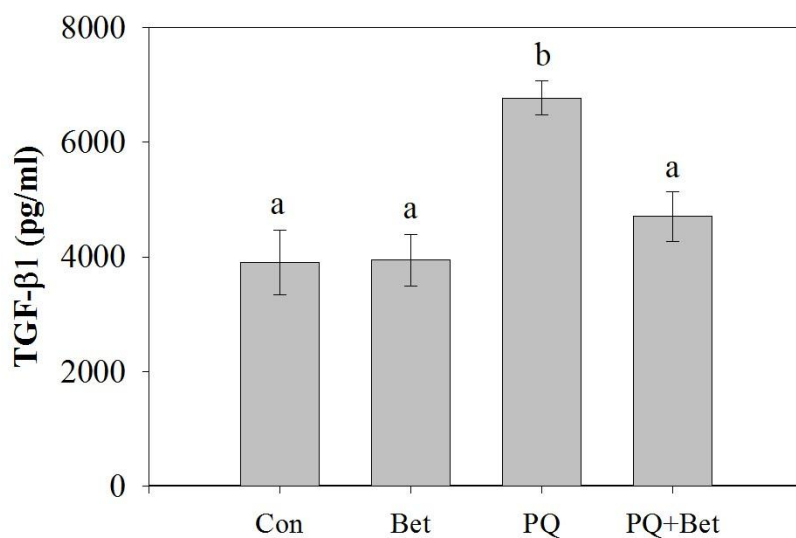


Figure 24. Serum TGF- β 1 levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$).

5. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 염증반응에 대한 betaine 의 영향

Paraquat 투여에 의한 폐의 염증정도를 확인하기 위하여 혈액과 조직내의 pro-inflammatory cytokine 인 IL-1 β 와 TNF- α 를 kit 를 사용하여 측정하였다.

Paraquat 투여에 의해 혈중 IL-1 β 는 control 의 57.61 \pm 0.96 pg/ml 에서 67.93 \pm 2.40 pg/ml 로 현저한 증가를 보였다. 이러한 변화에 betaine 투여는 69.14 \pm 5.17 pg/ml 로 아무런 영향을 주지 않았다. 혈중 TNF- α 는 paraquat 과 betaine 투여 모두 영향을 주지 않았다. 하지만 조직내의 TNF- α 는 control 의 53.91 \pm 8.82 pg/mg protein 에서 paraquat 에 의해 96.29 \pm 8.81 pg/mg protein 로 유의적인 증가를 하였으며 betaine 투여에 의해 68.65 \pm 8.32 pg/mg protein 으로 완화되었다 (Figure 25, 26, 27).

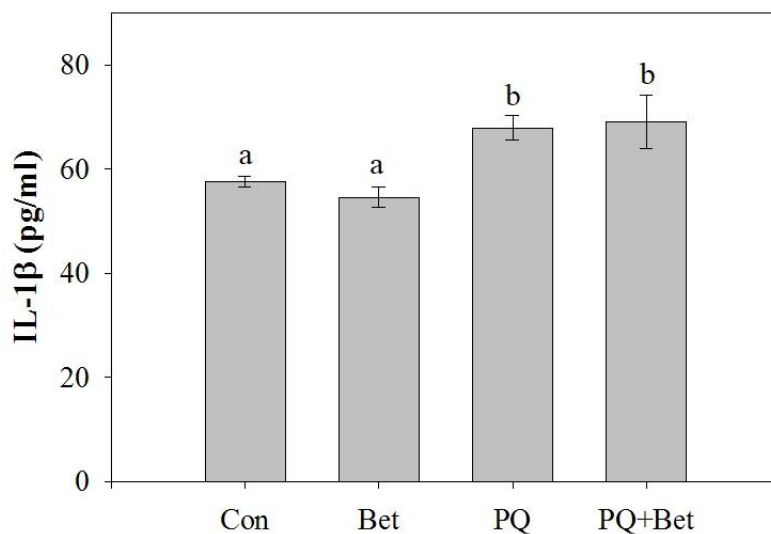


Figure 25. Serum IL-1 β levels at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, P<0.05).

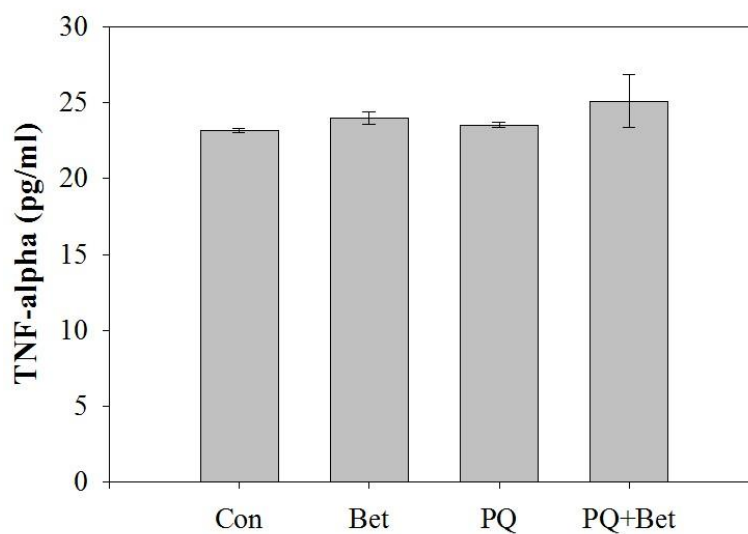


Figure 26. Serum TNF- α levels at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

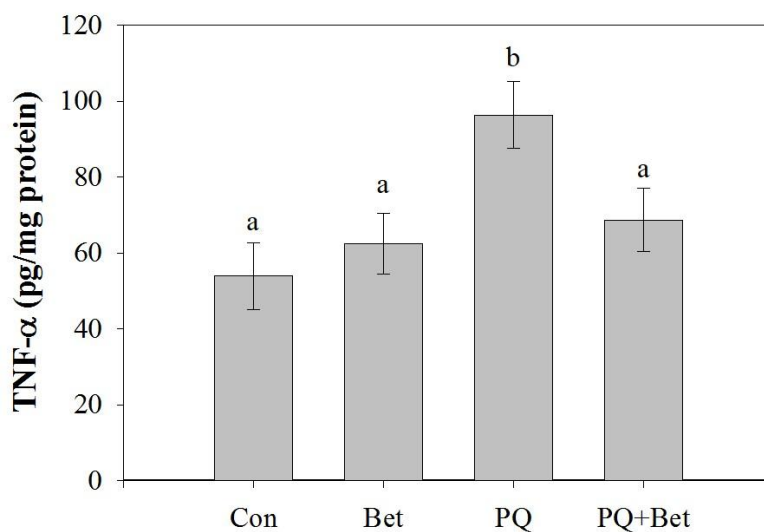


Figure 27. Tissue TNF- α levels at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P<0.05$).

6. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 염증반응에 대한 betaine 의 영향

Paraquat 투여에 의한 폐의 염증정도를 확인하기 위하여 혈액과 조직내의 pro-inflammatory cytokine 인 IL-1 β 와 TNF- α 를 kit 를 사용하여 측정하였다.

Paraquat 투여에 의한 혈중 IL-1 β , TNF- α 와 조직내의 TNF- α 모두 변화가 발생하지 않았고, betaine 투여 역시 변화가 없었다 (Figure 28, 29, 30).

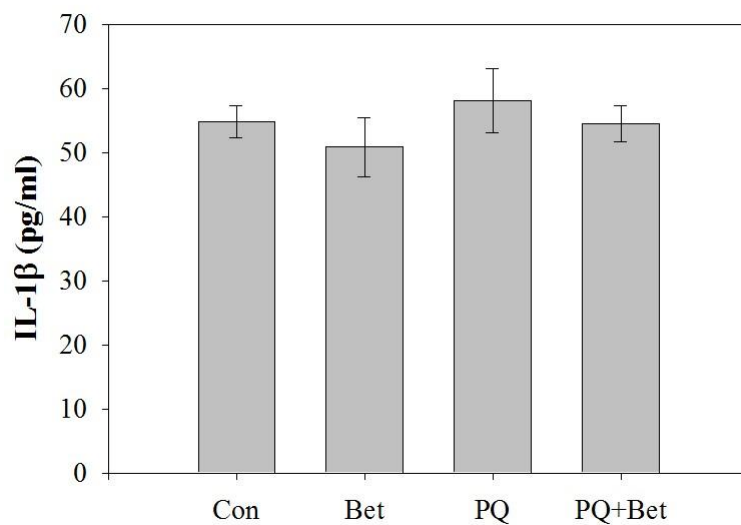


Figure 28. Serum IL-1 β levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

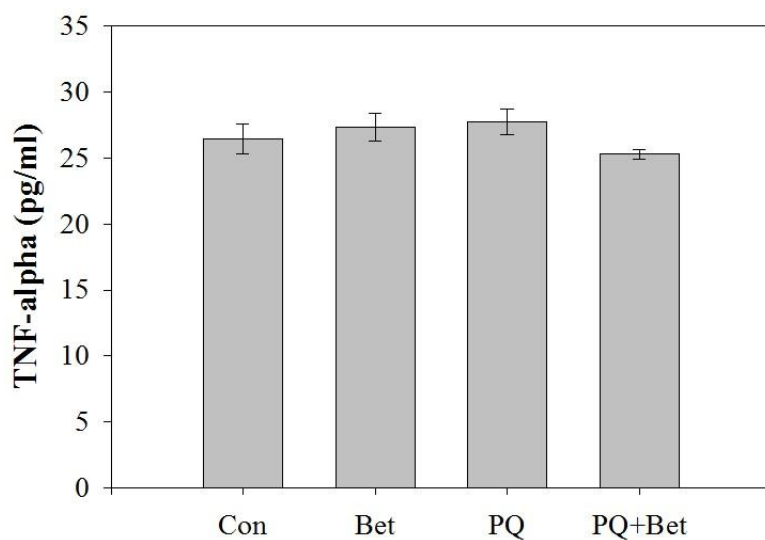


Figure 29. Serum TNF- α levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

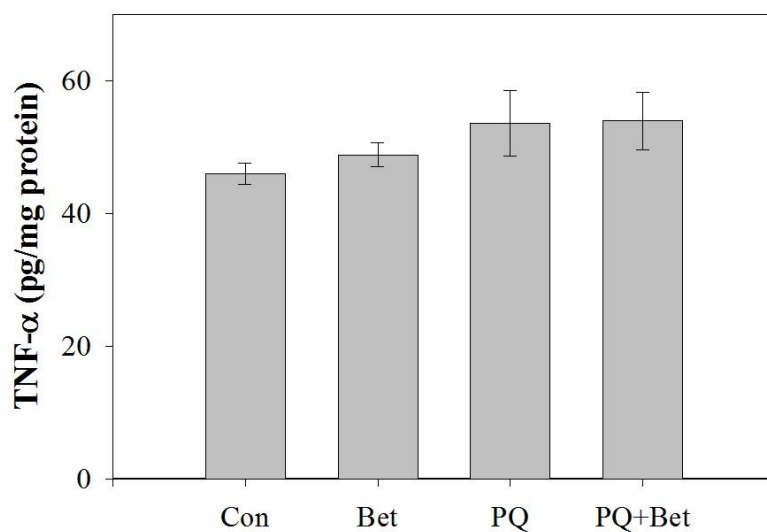


Figure 30. Tissue TNF- α levels in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation.

7. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 산화적 스트레스에 대한 betaine 의 영향.

범용적인 산화적 스트레스 지표로서 림프구의 DNA 손상정도를 comet assay 로 측정하였다. 손상정도를 객관적 기준에 의해 수치화 시킨 OTM 으로 계산하여 확인하였다. 산화적 스트레스와 관련된 HO-1, NF- κ B, 그리고 하위 유전자인 iNOS 의 단백질 발현양을 western blotting 을 통하여 확인하였고, specific total oxyradical scavenging capacity (TOSC) 를 측정하여 조직내의 항산화능을 측정하였다.

Paraquat 투여군에서 림프구의 DNA 손상이 control 군이나 betaine 군에 비해 유의적인 증가를 하였고 이러한 변화는 betaine 투여에 의해서 완화되었다 (Figure 31). Paraquat 투여에 의해 HO-1 과 NF- κ B 의 단백질 발현은 유의적인 증가를 보였고 iNOS 는 증가하는 경향을 보였다. 이러한 변화는 betaine 병용투여에 의해 유의적으로 감소하였다 (Figure 32). 체내 항산화능 지표인 TOSC 는 paraquat 투여에 의해 hydroxylradical, peroxyradical, peroxynitrite 에 대한 scavenging capacity 가 유의적으로 감소하였고 betaine 투여에 의해 다시 control 수준으로 회복되었다 (Figure 33).

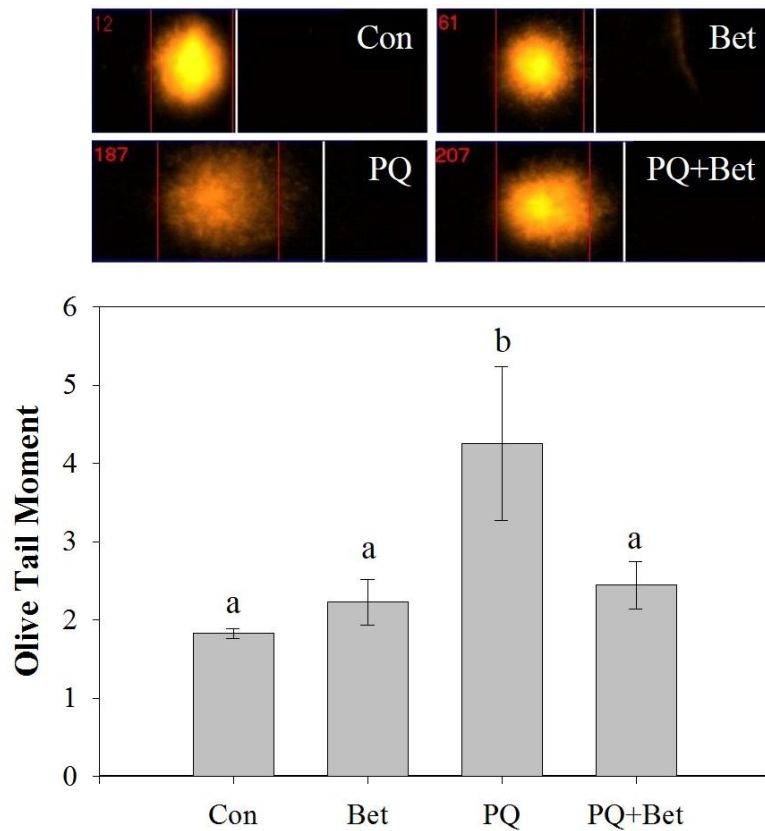


Figure 31. Oxidative DNA damage in lymphocyte at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

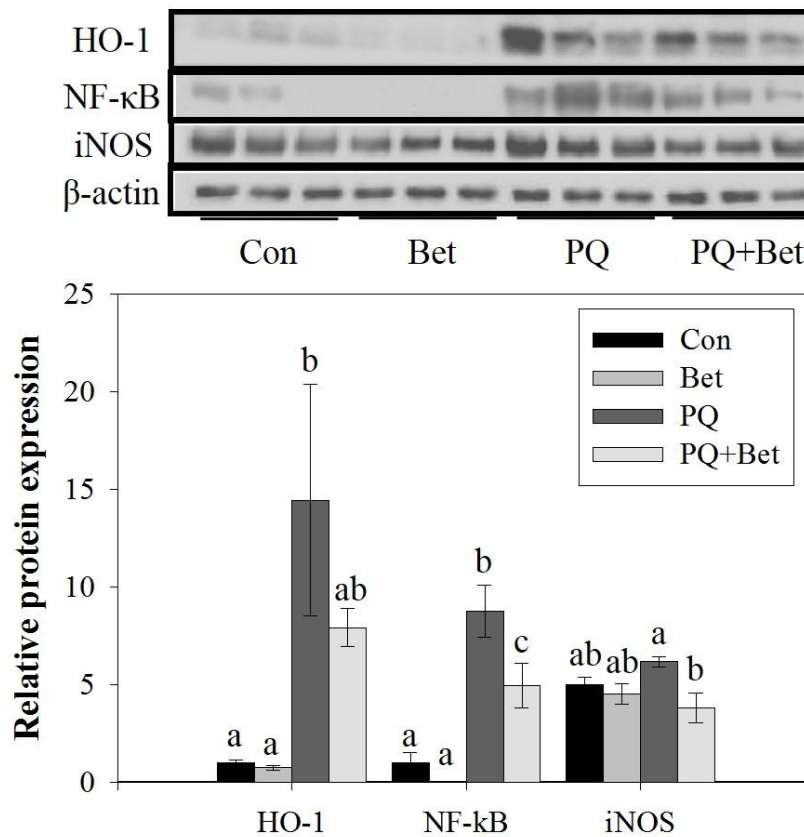


Figure 32. Protein expression of HO-1, NF- κ B, and iNOS in the lung of rats at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

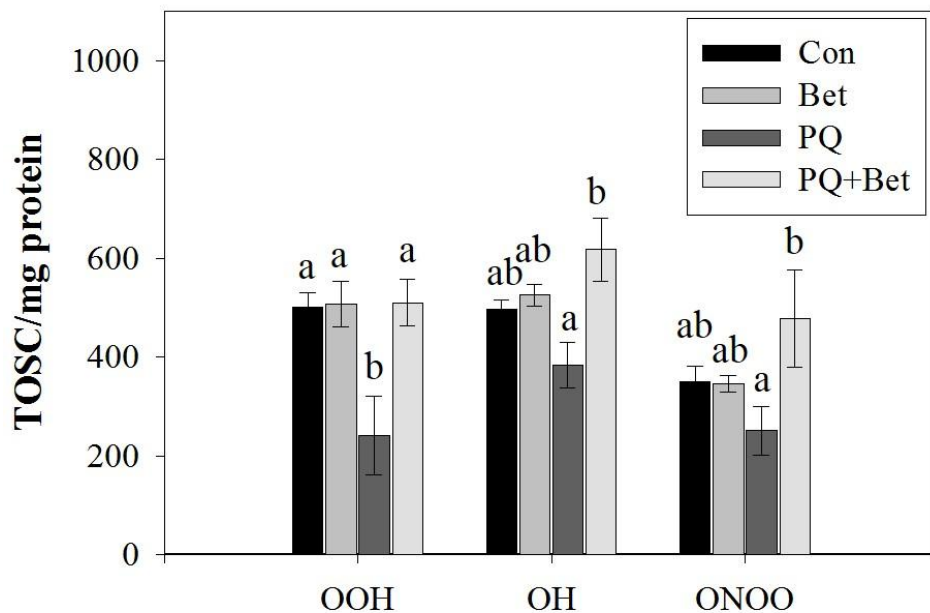


Figure 33. Specific TOSC in the lung of rats at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

8. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 산화적 스트레스에 대한 betaine 의 영향.

범용적인 산화적 스트레스 지표로써 림프구의 DNA 손상정도를 comet assay 로 측정하였다. 손상정도를 객관적 기준에 의해 수치화 시킨 OTM 으로 계산하여 확인하였다. 산화적 스트레스와 관련된 HO-1, NF- κ B, 그리고 하위 유전자인 iNOS 의 단백질 발현양을 western blotting 을 통하여 확인하였고, specific total oxyradical scavenging capacity (TOSC) 를 측정하여 조직내의 항산화능을 측정하였다.

Paraquat 투여군에서 림프구의 DNA 손상이 control 군이나 betaine 군에 비해 급격한 증가를 하였고 이러한 변화는 betaine 투여에 의해서 control 수준으로 완화되었다 (Figure 34). 산화적 스트레스와 관련된 HO-1, NF- κ B, 그리고 그의 하위 유전자인 iNOS 의 단백질 발현양을 western blotting 을 통하여 확인하였을 때, paraquat 투여에 의해 HO-1 와 iNOS 는 유의적으로 증가하였다. 이러한 변화는 betaine 병용투여에 의해 현저하게 감소하였다. 하지만 NF- κ B 는 paraquat 및 betaine 투여에 의한 변화가 없었다 (Figure 35). TOSC 는 paraquat 투여에 의해 peroxyradical, peroxyntirite 에 대한 scavenging capacity 가 유의적으로 감소하였고 betaine 투여에 의해 다시 control 수준으로 회복되었다 (Figure 36).

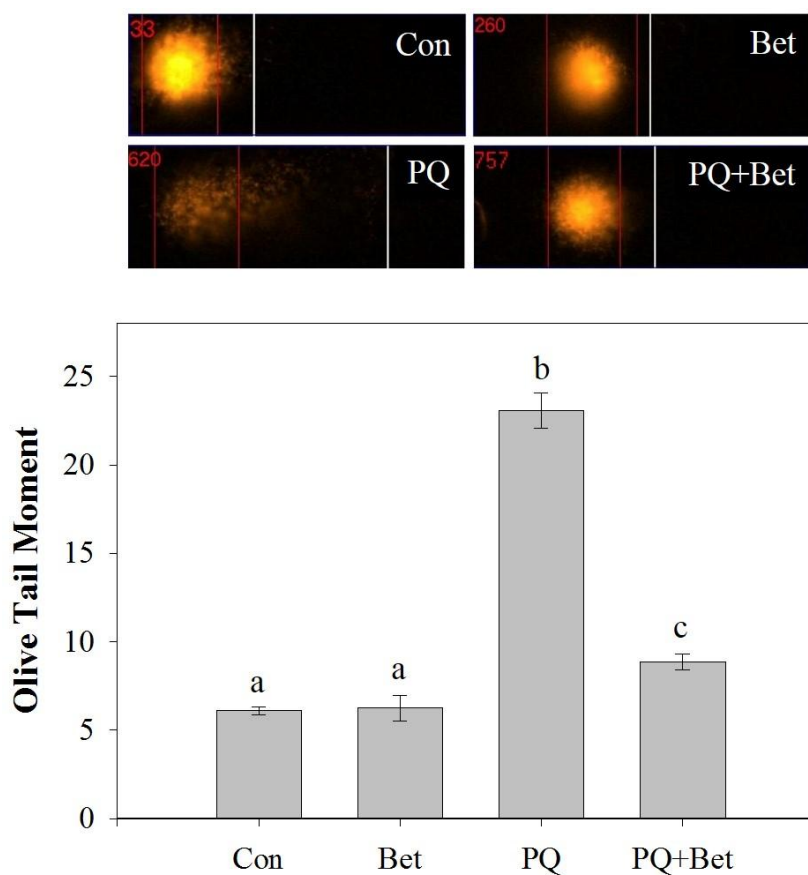


Figure 34. Oxidative DNA damage in lymphocytes 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

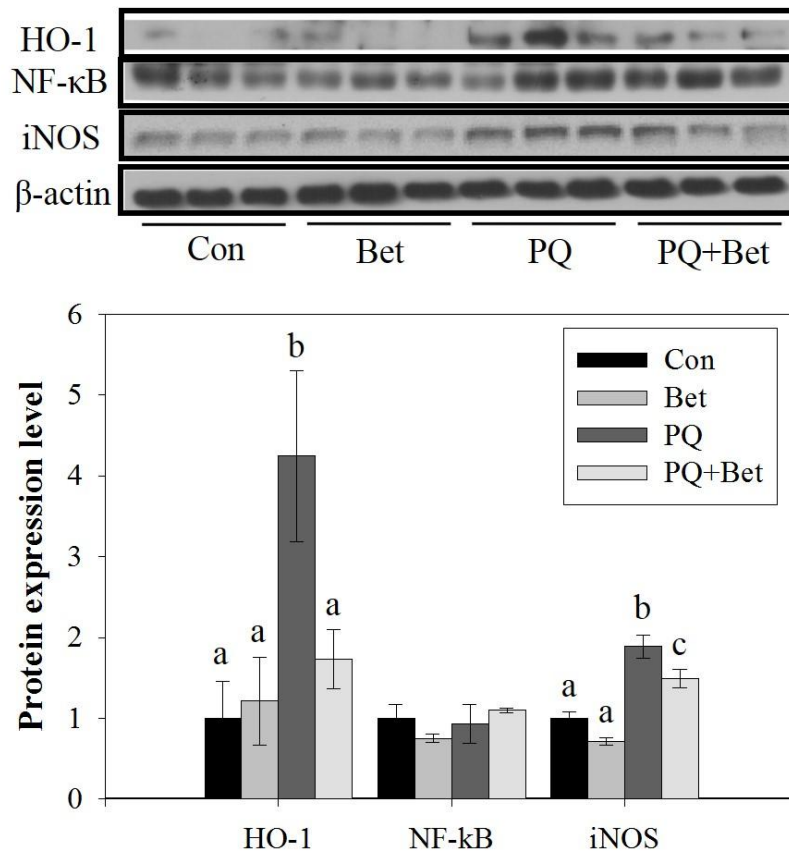


Figure 35. Protein expression of HO-1, NF- κ β , and iNOS in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

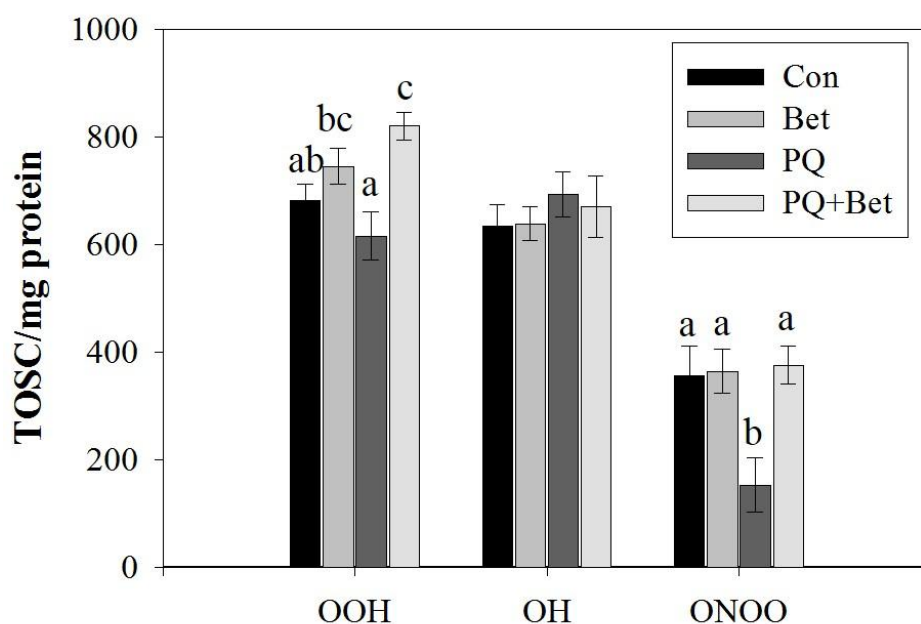


Figure 36. Specific TOSC in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

9. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화에 대한 betaine 의 영향

폐의 methionine 이 컨트롤군의 1.08 ± 0.07 nmole/mg protein 에서 betaine 과 paraquat 투여에 의해 각각 1.32 ± 0.19 , 1.37 ± 0.09 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보였고, paraquat 과 betaine 병용투여군에서 1.61 ± 0.12 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 확인하였다. SAM 은 control 군의 0.13 ± 0.00 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 0.17 ± 0.01 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 하였지만 betaine 과의 병용투여에 의한 변화는 0.17 ± 0.01 nmole/mg protein 으로 변화가 없었다. Homocysteine 은 control 군의 0.38 ± 0.03 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 0.45 ± 0.04 nmole/mg protein 으로 증가하였고, betaine 과의 병용투여에 의해 0.52 ± 0.08 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Cysteine 은 control 의 1.05 ± 0.04 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 2.03 ± 0.15 으로 급격히 증가하였으며 betaine 과의 병용투여에 의해 2.55 ± 0.16 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. GSH 은 control 의 13.64 ± 1.20 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 12.96 ± 0.71 nmole/mg protein 으로 변화가 없었지만, betaine 과의 병용투여에 의해 17.70 ± 1.01 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Hypotaurine 은 control 의 2.77 ± 0.30 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 3.84 ± 0.29 nmole/mg protein 으로 유의적인 변화를 보였으나, betaine 과의 병용투여에 의해 3.75 ± 0.44 nmole/mg protein 으로 변화는 보이지 않았다. Taurine 은 paraquat 과 betaine 투여에 의해 변화가 없었다.

Putrescine 의 전구체인 ornithine 은 control 의 4.20 ± 0.16 nmole/mg protein 에서 paraquat 에 의해 약 2 배인 7.92 ± 0.41

nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였으나, betaine 과의 병용 투여에 의해서는 7.41 ± 0.79 nmole/mg protein 으로 변화가 없었다. Putrescine 은 control 의 0.81 ± 0.08 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 약 2 배인 1.87 ± 0.34 nmole/mg protein 로 증가하였으나, betaine 과의 병용투여에 의해 변화가 보이지 않았다. Spermidine 은 control 의 4.63 ± 0.36 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 약 2 배인 8.26 ± 0.51 nmole/mg protein 로 증가하였지만, betaine 과의 병용투여에 의한 변화는 없었다. 그리고 spermine 역시 control 의 2.73 ± 0.44 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 약 2 배인 4.05 ± 0.24 nmole/mg protein 으로 증가를 보였지만 betaine 과의 병용투여에 의한 변화는 확인되지 않았다 (Table 4).

Table 4. Changes of sulfur containing amino acid and related substances in the lung of rats at 4 day after PQ instillation

(nmole/mg protein)	Con	Bet	PQ	PQ+Bet
Methionine	1.08±0.07 ^a	1.32±0.19 ^{ab}	1.37±0.09 ^{ab}	1.61±0.12 ^b
SAM	0.13±0.00 ^a	0.13±0.00 ^a	0.17±0.01 ^b	0.17±0.01 ^b
SAH	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.10±0.00 ^b	0.11±0.01 ^b
Homocysteine	0.38±0.03 ^a	0.40±0.02 ^{ab}	0.45±0.04 ^b	0.52±0.08 ^c
Cysteine	1.05±0.04 ^a	1.10±0.16 ^a	2.03±0.16 ^b	2.55±0.16 ^c
GSH	13.64±1.20 ^a	13.84±0.66 ^a	12.96±0.71 ^a	17.70±1.01 ^b
Hypotaurine	2.77±0.30 ^a	3.46±0.23 ^{ab}	3.84±0.29 ^b	3.75±0.44 ^{ab}
Taurine	59.57±4.46	57.36±1.66	51.32±2.48	59.50±4.39
Ornithine	4.20±0.16 ^a	4.62±0.74 ^a	7.92±0.41 ^b	7.41±0.79 ^b
Putrescine	0.81±0.08 ^a	0.87±0.09 ^a	1.87±0.34 ^b	1.96±0.17 ^b
Spermidine	4.63±0.36 ^a	4.46±0.44 ^a	8.26±0.51 ^b	8.08±0.88 ^b
Spermine	2.73±0.44 ^a	2.33±0.19 ^a	4.05±0.24 ^b	3.59±0.30 ^b

Each value represents the mean±SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, P<0.05).

10. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 황함유 아미노산과 관련 물질 농도 변화에 대한 betaine 의 영향

폐의 methionine 은 control 의 0.90 ± 0.10 nmole/mg protein 에서 betaine 단독투여에 의해 1.38 ± 0.12 nmole/mg protein 으로 유의적으로 증가하였다. Paraquat 투여에 의해 1.28 ± 0.13 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보였으며, betaine 과의 병용투여에 의해 1.22 ± 0.12 nmole/mg protein 으로 변화는 없었다. SAM 은 control 군의 0.14 ± 0.01 nmole/mg protein 에서 betaine 단독투여에 의해 0.16 ± 0.01 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가가 확인 되었다. Paraquat 투여에 의해 0.17 ± 0.0 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였고, betaine 과의 병용투여에 의해 0.18 ± 0.0 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보였다. SAH 는 SAM 과 비슷한 경향을 보였지만 유의적인 변화는 없었다. Homocysteine 은 control 의 0.39 ± 0.01 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 0.42 ± 0.01 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보였고, betaine 과의 병용투여에 의해 0.47 ± 0.03 nmole/mg protein 으로 증가하는 경향을 보였다. Cysteine 은 control 의 1.19 ± 0.09 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 1.80 ± 0.17 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가하였고, betaine 과의 병용투여에 의해 1.48 ± 0.05 nmole/mg protein 으로 감소되었다. GSH 은 control 의 15.64 ± 0.56 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 10.71 ± 0.73 nmole/mg protein 으로 유의적인 감소를 하였고, betaine 과의 병용투여에 의해 18.22 ± 0.64 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Hypotaurine 은 control 의 0.87 ± 0.11 nmole/mg protein 에서 betaine 투여에 의해서만 1.37 ± 0.10 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Taurine 은 paraquat 과 betaine 투여에 의해서 변화가 없었다.

폐에서 putrescine 의 전구체인 ornithine 은 paraquat 과 betaine 에 의한 변화는 보이지 않았다. Putrescine 은 control 의 0.59 ± 0.12 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 0.86 ± 0.11 nmole/mg protein 으로 변화는 없었으나 betaine 과의 병용투여에 의해서 2.32 ± 0.57 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Spermidine 은 control 의 6.86 ± 1.91 nmole/mg protein에서 paraquat 투여에 의해 4.40 ± 0.96 nmole/mg protein 으로 감소하는 경향을 보였으나 betaine 과의 병용투여에 의해서 11.94 ± 1.67 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가를 보였다. Spermine 은 control 의 4.20 ± 1.16 nmole/mg protein 에서 paraquat 투여에 의해 3.14 ± 0.68 nmole/mg protein 으로 감소하는 경향을 보였고 betaine 과의 병용투여에 의해 7.60 ± 1.10 nmole/mg protein 으로 유의적인 증가가 확인되었다 (Table 5).

Table 5. Changes of sulfur containing amino acid and related substance in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation

(nmole/mg protein)	Con	Bet	PQ	PQ+Bet
Methionine	0.90±0.10 ^a	1.38±0.12 ^b	1.28±0.13 ^{ab}	1.22±0.12 ^{ab}
SAM	0.14±0.01 ^a	0.16±0.01 ^b	0.17±0.00 ^{bc}	0.18±0.00 ^c
SAH	0.05±0.02	0.05±0.02	0.06±0.02	0.08±0.02
Homocysteine	0.39±0.01 ^a	0.42±0.04 ^{ab}	0.42±0.01 ^{ab}	0.47±0.03 ^b
Cysteine	1.19±0.09 ^a	1.16±0.04 ^a	1.80±0.17 ^b	1.48±0.05 ^a
GSH	15.64±0.56 ^a	14.78±2.02 ^a	10.71 ^b ±0.73	18.22±0.64 ^a
GSH/GSSG	2.93±0.18 ^a	2.59±0.39 ^a	1.67±0.15 ^b	3.22±0.04 ^a
Hypotaurine	0.87±0.11 ^a	1.37±0.10 ^b	0.94±0.19 ^a	0.89±0.06 ^a
Taurine	36.04±2.44	33.40±2.61	40.97±1.70	37.10±4.17
Ornithine	3.08±0.34	3.71±0.29	3.61±0.49	4.19±0.87
Putrescine	0.59±0.12 ^a	0.64±0.10 ^a	0.86±0.11 ^a	2.32±0.57 ^b
Spermidine	6.86±1.91 ^{ab}	6.59±1.54 ^{ab}	4.40±0.96 ^a	11.94±1.67 ^b
Spermine	4.20±1.16 ^{ab}	4.17±0.94 ^{ab}	3.14±0.68 ^a	7.60±1.10 ^b

Each value represents the mean±SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation. Values with different letters (a, b) are significantly different from each other (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, P<0.05).

11. Paraquat 투여 4 일 후, 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화에 대한 betaine 의 영향

황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소들의 단백질 발현양을 western blotting 을 통하여 확인하였다 (Figure 37). MATII 는 control 군의 발현양에 비해 betaine 과 paraquat 단독투여군에서 증가하는 경향을 보였고, paraquat 과 betaine 병용투여군에서는 유의적인 증가를 보였다. C β S 는 control 군의 발현에 비해 betaine 단독투여군에서 유의적인 증가를 보였다. Paraquat 투여는 control 군의 발현에 비해 betaine 단독투여군 보다 더 많은 발현을 보였으며, betaine 과의 병용투여에 의해서는 변화가 없었다. CDO 는 control 군의 발현에 비해 paraquat 투여군에서 유의적인 감소를 보였으며, betaine 과의 병용투여군에서는 변화가 없었다. GCLC 는 control 군의 발현에 비해 paraquat 투여에 의해 유의적으로 감소하였고 betaine 과의 병용투여군에 의해 변화가 없었다.

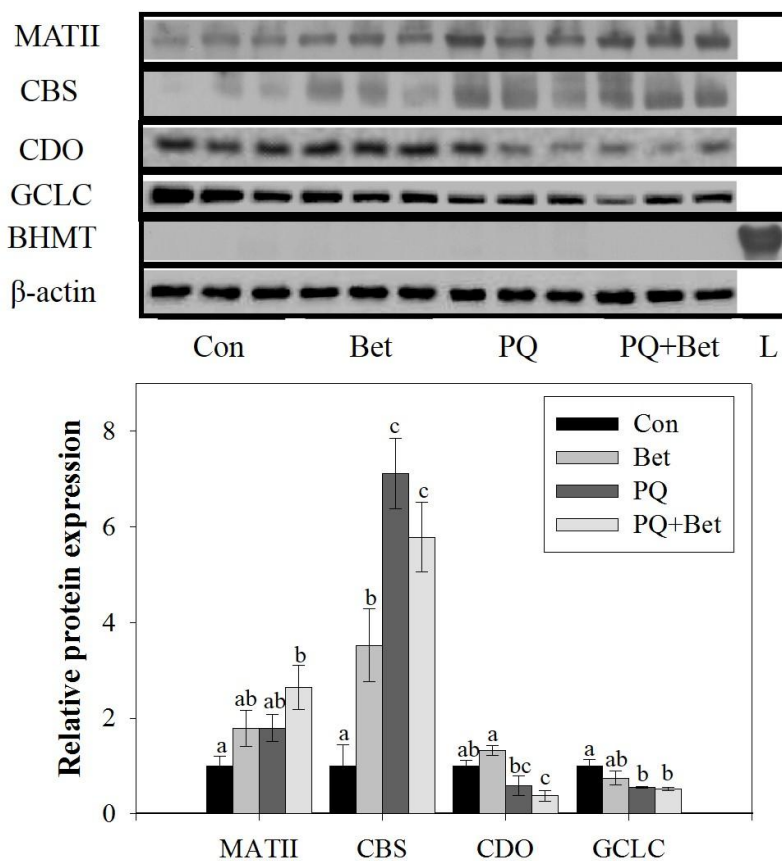


Figure 37. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism in the lung of rats at 4 day after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 6 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation; L, Liver. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

12. Paraquat 투여 2 주 후, 유발된 황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소 변화에 대한 betaine 의 영향

황함유 아미노산 대사를 매개하는 효소들의 단백질 발현양을 western blotting 을 통하여 확인하였다 (Figure 38). MATII 는 control 군의 발현양에 비해 betaine 과 paraquat 단독투여군에서 유의적으로 증가하였다. Paraquat, betaine 병용투여군에서는 paraquat 투여군의 발현양에 비해 유의적인 증가를 보였다. C β S 는 control 군의 발현양에 비해 betaine 과 paraquat 단독투여군에서 변화를 보이지 않았지만, paraquat 과 betaine 병용투여군에서는 유의적으로 증가하였다. CDO 는 control 군의 발현양에 비해 paraquat 단독투여군에서 유의적으로 감소하였고, betaine 과의 병용투여에 의해 변화는 없었다. GCLC 는 control 군의 발현양에 비해 paraquat 투여군에서 유의적인 감소를 보였고, betaine 과의 병용투여에 의해 유의적으로 증가하였다.

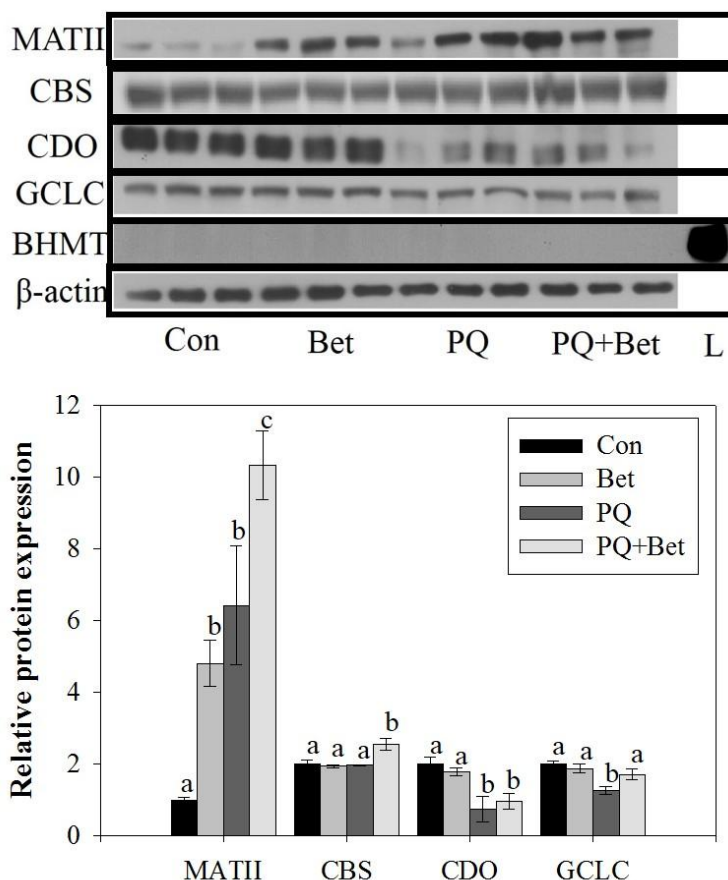


Figure 38. Protein expression of enzymes related to sulfur containing amino acid metabolism in the lung of rats at 2 wk after PQ instillation. Each value represents the mean \pm SEM for 5 rats. Con, control rats; Bet, rats fed betaine; PQ, PQ instilled rats; PQ+Bet, rats fed betaine before PQ instillation; L, Liver. Values with different letters (a, b, c) are significantly different from one another (ANOVA followed by Student Newman Keuls multiple range test, $P < 0.05$).

고 찰

산화적 스트레스 완화를 통한 betaine 의 간 보호효과는 다양한 독성물질로 손상을 유발시킨 모델을 통해 확인되었다 (Ganesan et al., 2011; Hayes et al., 2003; Ji and Kaplowitz 2003; Yang et al., 2017). Betaine 투여에 의한 약리학적 보호효과는 황함유 아미노산 대사에서 methionine 의 재생산을 담당하는 대사효소인 BHMT 와 methionine 으로부터 SAM 을 주로 합성하는 MAT I/III 때문에 발생한다 (Kim et al., 2005). 하지만 이 두 효소는 간 특이적으로 발현하기 때문에 실질적으로 간 이외의 장기에서 황함유 아미노산 대사를 작용점으로 하는 약리학적 연구에 대해 거의 연구되어 있는 바가 없다.

본 실험실의 선행 연구자는 betaine 을 2 주 동안 투여한 랫트에서 신장의 황함유 아미노산 대사 변화를 확인하였다. Betaine 의 효용성 있어서 중요한 효소인 BHMT 와 methionine 재합성을 위한 MS 의 변화는 없었지만 control 군에 비해 MAT II 발현 및 활성 증가와 함께 methionine, SAM 이 유의적으로 증가하였고 혈중 methionine 증가가 확인되었다 (Kim et al., 2014). 이 연구는 betaine 투여에 의한 간의 methionine 증가가 혈액을 통해 간을 제외한 장기에서도 황함유 아미노산의 변화를 유발시킬 수 있다는 가능성을 제시한다. 따라서 본 연구에서는 간 이외의 장기인 폐를 선택하였고 paraquat 으로 섬유화를 유발시킨 폐손상 모델을 사용하여 betaine 의 보호효과를 확인하였다.

폐섬유화는 비가역적인 병변으로 만성폐쇄성폐질환 (COPD), 폐렴, 폐암, 급성호흡관증후군과 같은 폐질환이 만성적으로 진행될 경우 발생한다고 알려져 있다 (Bhattacharyya et al., 2012; Jeffery, 2001). 현재까지 알려진 폐섬유화의 발병기전은 외부의 독성물질 유입에 의한 산화/환원간의 불균형에 의해 공통적으로 시작된다. 이러한 불균형은 활성산소종을 증가시켜 직접적으로는 DNA 손상을 유발하거나

TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine 의 증가를 통하여 다양한 염증반응을 유도한다. 증가한 염증반응은 주로 pro-fibrotic cytokine 으로 알려진 활성화된 TGF- β 1 을 유발하거나 또는 활성산소종에 의하여 조절되는 hypoxia inducible factor 1 (HIF-1 α), glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) 와 같은 중간 매개체를 통하여 TGF- β 1 이 유발한다. 이렇게 증가한 TGF- β 1 은 단백질 snail 을 통해 epithelial mesenchymal transition (EMT) 을 증가시키거나 smad signaling 조절에 의해 myofibroblast 를 콜라겐/세포외기질 (ECM) 로 변화시켜 섬유화를 발생시킨다 (Kinnula et al., 2005; Xie et al., 2013). 이처럼 과도한 활성산소종에 의해 발생하지만 다양한 요인과 기전이 관여하기 때문에 폐섬유화를 억제하는 방법이 아직 뚜렷하게 제시되지 않고 있다. 현재 다양한 연구에서 Infliximab 과 같은 TGF- β 1 길항제가 폐섬유화를 억제시킨다는 결과가 있지만, 섬유화 발생기전 이외의 상처 치료 및 다양한 조절에 관여한다고 알려진 TGF- β 1 억제에 의해 손상된 조직의 회복이 늦춰지거나 세포의 생리적 활동이 저해되는 부작용도 발생한다고 보고된다 (Altintas et al., 2016; Lamouille et al., 2014; Li et al., 2015; Willis and Borok 2007; Woods et al., 2015; Yamada et al., 2015). 반면, 항산화 물질을 통해 활성산소종 발생을 억제하여 폐손상 및 폐섬유화 억제효과를 확인한 연구들이 많이 보고되고 있다. N-acetylcysteine 의 투여는 담배연기를 흡입시킨 마우스 모델과 임상 실험모델에서 nuclear erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) 를 통한 세포손상 완화를 확인하였고, Carissa Obacca (자두과 식물)의 추출액을 투여하여 항산화 관련 효소와 GSH 의 합성 증가를 통하여 CCl₄ 로 유발시킨 랫트의 폐손상을 완화시켰다 (Messier et al., 2013; Sahreen et al., 2014; Santus et al., 2014; Shohrati et al., 2014). 또한 in vivo, in vitro 모델에서 paraquat 으로 유발시킨 폐손상을 quercetin 투여에 의한 항산화 물질 증가를 통하여 보호효과를 확인하였다 (Park et al., 2010; Zerin et al., 2013). 최근 폐독성 모델에서

betaine 의 보호효과를 발표한 논문이 있지만 그 작용점이나 기전에 대해서는 논리적인 연구가 진행되지 않았다 (Bingula et al., 2016; Sehirli et al., 2016).

폐섬유화 모델을 만들기 위해 외과적 수술 없이 기도에 삽관하여 직접적으로 paraquat 을 투여하였고, 농도별 투여를 통해 폐손상 지표의 변화 발생과 황함유 아미노산 대사가 유지되는 0.3 mg/kg bw 의 농도를 선택하였다. 황함유 아미노산 대사를 연구하는 실험목적에 적합한지 확인하기 위해 paraquat 투여에 의한 시간대별 폐손상 지표 변화와 황함유 아미노산 대사의 변화를 0 시, 24 시, 1 주, 2 주 시간대에서 확인하였다.

Paraquat 투여에 의해 몸무게는 1 주 시간대에서부터 의미있는 감소를 보였고 이러한 변화는 24 시 시간대에서 폐무게의 유의적인 증가와 관련이 있음을 예상하였다 (Figure 5, 6). 몸무게 대비 폐무게 비율의 유의적인 증가는 폐부종과 같은 다양한 병리조직학적 변화의 발생을 의미한다 (Figure 7). 이러한 변화는 Wyatt et al., (1981) 의 실험 모델에서도 확인되었다. 기관지 절개를 통해 왼쪽 폐에만 0.1 mg 의 paraquat 을 투여한 모델에서 24 시 시간대부터 폐무게가 유의적으로 증가하였고, 2 일 시간대에서 부종, 염증세포 침윤, 응혈, 폐포벽 비대화가 발견되었으며 14 일 시간대에서 섬유화를 발견하였다. 이러한 조직병리학적 진단결과는 본 실험 결과에서도 확인되었다. Paraquat 투여에 의해 24 시 시간대에서는 기관지 근처에서 림프구의 응집과 염증세포의 침윤이 발견되었고 약간의 폐부종도 발생하였다. 1 주 시간대에서는 염증세포와 결합조직 증가에 의해 폐포벽이 두꺼워지고 폐부종이 보이며 세기관지의 표피세포 비대화가 관찰되었고 2 주 시간대에서는 섬유화면적이 유의적으로 증가하였다 (Figure 8). 폐섬유화의 다른 지표로서 콜라겐의 구성성분인 4-hydroxyproline 의 양을 측정한 결과 1 주 시간대에서부터 유의적인 증가가 확인되었다. Paraquat 투여 후 24 시 시간대에서 발생된 유의적인 감소는 폐구조 관련 세포의 붕괴와 같은 현상에 의한 것으로 추측된다 (Figure 9). Comet assay 를 통해 림프구의

산화적 DNA 손상을 측정하였다. 림프구의 DNA 손상은 대표적인 산화적 스트레스의 지표로서 COPD 환자의 손상 지표나, 폐의 산화적 스트레스 지표로 사용되고 있다 (Kaled et al., 2018; Minerva et al., 2010). 시간 흐름에 따른 림프구 DNA 손상의 증가는 paraquat 단일 투여에 의해 2 주 동안 산화적 스트레스의 증가 및 유지가 되고 있음을 의미한다 (Figure 10).

Paraquat 투여에 의해 섬유화가 진행되는 폐독성 모델에서 황함유 아미노산 대사의 변화를 확인하기 위해 시간대별로 대사물의 양과 관련된 효소들을 확인하였다 (Table 1, Figure 11). Paraquat 투여 이후 2 주 시간대에서 methionine 의 농도가 유의적으로 감소하였고 1 주 시간대에서 MAT II 의 증가와 SAM 의 유의적인 증가가 확인되었다. 폐의 황함유 아미노산 대사에 관해서 거의 알려진 바가 없지만, Panayiotidis et al., (2004, 2006) 의 결과에 따르면 hyperoxia 조건에 노출된 폐표피세포주 (A549) 에서 MAT II 단백질의 발현 및 활성과 methionine 의 농도 증가가 확인되었고 SAM 이 유의적으로 증가하였다. 또한 같은 세포주에 담배연기를 노출 시켰을 때 SAM 의 증가를 확인한 결과도 있었다. SAM 은 다양한 독성모델에서 transmethylation 반응을 통한 보호효과가 확인되었고, SAM 의 투여에 의해 폐의 염증과 섬유화가 억제되었다는 연구결과도 발표되었다 (Lu and Mato 2012; Yoon et al., 2016). 본 실험 결과에서 2 주 시간대의 methionine 과 MAT II 는 1 주 시간대보다 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과를 종합하면, paraquat 투여에 의해 폐는 자체적으로 보호를 하기 위한 SAM 합성 증가가 유도되고, 자극이 계속되면 methionine 의 결핍이 유도되어 transmethylation 반응이 저해됨을 시사한다. Homocysteine 은 24 시 시간대에서 C β S 의 유의적인 발현 증가에 의해 감소하였다. C β S 는 homocysteine 의 농도를 조절하는 주요효소로 생각되고 있으며, C β S 의 활성 감소나 유전적 손실은 혈중 homocysteine 의 농도가 상승된 hyperhomocysteinemia 를 유발하게 된다 (Choumenkovitch et al., 2002; Mudd 2011; Yap and Naughten 1998). C β S 조절기전은

현재까지 알려진 바가 거의 없지만, methionine 의 농도 증가가 C β S 의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다 (Shi et al., 2019). C β S 는 heme 을 포함하는 효소로서 SAM 에 의해 안정화되고 산화적 스트레스 발생 시 그 활성이 증가하는 것으로 알려졌다 (Angel et al., 2013; Banerjee and Zou 2005; Janosik et al., 2001; Pey et al., 2013). 또한 C β S 를 과발현 시켰을 때 파킨슨 랫트 모델에서 신경 보호효과도 보고되었다 (Yin et al., 2017). 24 시 시간대부터 cysteine 은 유의적인 증가를 보였고 1 주 시간대부터 CDO 의 발현 감소도 함께 하였다. 현재까지 연구된 CDO 증가는 cysteine availability 에 의해 조절되어 고농도의 cysteine 은 CDO mRNA 와 단백질 발현을 증가시켜 taurine 으로의 대사를 촉진시키고, 낮은 농도의 cysteine 은 GSH 로 유도됨을 확인하였다 (Bella et al., 1999; Kwon and Stipanuk, 2001; Stipanuk et al., 2006). Paraquat 에 의한 CDO 발현 억제 기전은 분명하지 않지만, 임상적으로 류마티스 관절염, 파킨슨, 알츠하이머, 유방암과 같은 다양한 질병을 가진 환자에게서 CDO 발현 억제가 확인되었다 (Bradley et al., 1994; Gordon et al., 1992; Heafield et al., 1990). In vitro 실험에서는 난소암, 폐암, 유방암 세포주에서 CDO 의 promoter 메틸화에 의한 mRNA 감소가 유발된다는 연구가 보고되었고, 에탄올 급성투여에 의한 간의 CDO mRNA 감소를 확인하였다 (Ahn et al., 2015; Brait et al., 2012; Jeschke et al., 2013; Kim et al., 2003). 또한 유방암 세포주 (MDA-MB-231) 에서 CDO 억제에 의해 ROS 생성의 감소를 확인하였고 (Jeschke et al., 2013), 폐와 관련된 연구로는 폐표피세포주 (A549)에 hyperoxia 조건을 노출시켰을 때, SAM 합성 증가와 cysteine-GSH 대사로 유도됨을 확인하였다 (Panayiotidis et al., 2006). 본 실험에서 paraquat 투여에 의해 24 시 시간대의 hypotaurine 과 taurine 이 유의적으로 감소하였고, GSH 은 1 주 시간대에서 유의적인 증가를 보였다. 이러한 결과를 종합하면, CDO 의 감소는 산화적 스트레스로부터 보호작용을 위해 GSH 의 합성을 위한 cysteine 의 집중적인 공급을 의미한다. 1 주 시간대에 비해 2

주 시간대에서 GSH 의 감소는 산화적 스트레스의 축적과 황함유 아미노산의 결핍에 의한 것으로 예상되고, 2 주 시간대에서 hypotaurine 의 감소와 높은 taurine 의 농도는 GSH 감소에 대한 보상성 반응으로 추측된다.

SAM 으로부터 aminopropyl 기를 받는 polyamine 합성대사 역시 paraquat 투여에 의해 변화가 발생하였다. Putrescine 과 전구체 ornithine 은 24 시 시간대에서 증가하여 1 주 시간대와 2 주 시간대에서 높은 농도를 유지하였다. Polyamine 대사에 대한 paraquat 의 역할은 아직 알려진 바가 없지만, 폐포자충성 폐렴 랫트 모델에서 SAM 의 감소와 함께 putrescine 의 유의적인 증가를 확인하였고, polyamine 합성 대사에 관여하는 polyamine acetylation 과 SAM decarboxylase 의 활성 증가를 확인하였다 (Shivji et al 2005). Polyamine 은 DNA, RNA, protein 의 합성 안정성을 증가시켰고, 특히 spermidine 은 eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) 의 전구체로 단백질 합성에 안정성을 연장시켰다 (Janne et al., 1991; Park 2006). 또한 활성산소로 유발시킨 폐독성 모델에서 polyamine 투여에 의한 보호효과가 있음을 확인하였다 (Elsayed et al 1990; Ha et al., 1998; Hacker et al., 1983). 이러한 결과를 종합하면, polyamine 의 합성 증가도 paraquat 투여에 의해 발생한 손상에 대한 자체적 보호기전으로 예상된다.

Paraquat 투여에 의해 섬유화가 진행되는 폐에서 2 주 동안의 황함유 아미노산 대사 변화를 통해 발생하는 보호기전과 시간에 따른 황함유 물질의 가용성 감소를 확인했다. 따라서 paraquat 으로 유발된 폐 섬유화 모델에서 betaine 투여에 의한 보호효과를 확인하고자 하였다. 폐섬유화는 ‘염증진행구간’ 과 ‘섬유화진행구간’ 을 통해 발생하고 두 구간이 교차되는 ‘스위치’ 구간은 처음 손상을 가한지 약 9 일 정도에 발생한다는 연구결과가 발표되었다 (Chaudhary et al., 2006). 따라서 각 구간에서 betaine 의 역할을 알아보기 위해 paraquat 투여 후 4 일과 14 일에서 샘플을 취하여 실험을 진행하였다.

본 연구결과에서 염증진행구간(4일)에는 paraquat 투여에 의한 몸무게 감소와, 폐무게 증가에 대한 betaine 투여의 완화효과는 없었지만 (Figure 12, 13, 14), 섬유화진행구간(14일)에서는 몸무게 감소가 betaine 투여에 의해 유의적으로 증가하여 결과적으로 paraquat 투여에 의해 증가한 몸무게 대비 폐무게 비율이 betaine 투여에 의해 유의적으로 회복되었다 (Figure 15, 16, 17). Masson' s trichome staining 을 통해 섬유화진행 정도를 확인하였을 때, 염증진행구간(4일)에는 paraquat 투여에 의한 콜라겐 증가가 betaine 투여에 의한 유의적인 완화는 보이지 않았지만 (Figure 19), H&E staining 을 통해 확인된 조직병리학적 진단결과에서 betaine 투여에 의한 염증세포의 침윤 억제와 호산성 초자자양물질의 생성 억제를 확인할 수 있었다 (Figure 18, Table 2). 섬유화진행구간(14일)에는 조직병리학적 병변 발생이 betaine 투여에 의해 유의적으로 감소하였고 (Figure 21, Table 3), Masson' s trichome staining 과 4-hydroxyproline 측정을 통해 paraquat 투여에 의한 콜라겐 증가가 감소됨을 확인할 수 있었다 (Figure 22, 23). 이러한 결과는 염증진행구간(4일)에서 관찰된 betaine 투여에 의한 염증증상 완화가 이후 섬유화진행구간(14일)에서 관찰된 콜라겐 축적 완화에 대한 중요한 요인임을 암시한다.

염증반응의 변화를 살펴보기 위해 proinflammatory cytokine 인 $TNF-\alpha$ 와 $IL-1\beta$ 그리고 profibrotic cytokine 인 $TGF-\beta 1$ 를 측정하였다. 염증진행구간(4일)에서 혈중 $TNF-\alpha$ 는 paraquat 투여에 의한 변화는 보이지 않았다 (Figure 26). 하지만 조직내 $TNF-\alpha$ 는 paraquat 투여에 의해 유의적으로 증가하였고, betaine 투여에 의해 완화되었다 (Figure 27). 섬유화진행구간(14일)에서는 paraquat 투여에 의한 혈중 및 조직내 $TNF-\alpha$ 의 변화는 확인되지 않았다 (Figure 29, 30). $TNF-\alpha$ 는 LPS 에 노출시켜 급성 폐 염증을 일으킨 모델에서 염증 초반에 급격하게 생성된다는 연구결과가 있으며 (Arreto et al., 1997; Johnston et al., 1998), $TNF-\alpha$ mRNA 는 bleomycin 투여로 유발시킨 폐섬유화 모델에서 4 ~ 7 일 사이에 유의적인 증가를 보였

다 (Phan and Kunkel 1992). 또한 폐에 염증을 유발시킨 모델에서 bronchoalveolar lavage fluid (BALF) $\text{TNF-}\alpha$ 의 증가는 확인되었지만 혈중 $\text{TNF-}\alpha$ 는 변화가 발생하지 않는 연구결과가 보고되었다 (Li et al., 2013; Vernooy et al., 2001). 본 실험 결과는 조직에서 BALF 를 채집하지 않았기 때문에 paraquat 투여에 의한 $\text{TNF-}\alpha$ 의 변화를 확인할 수 있었다고 예상한다. 또한 $\text{TNF-}\alpha$ 는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 기전에 의해 산화적 스트레스로부터 영향을 받는다고 알려져 있으며 (Poli et al., 2004), 항산화 물질을 통한 $\text{TNF-}\alpha$ 축적 억제도 많은 연구에서 보고되었다 (Cu et al., 2009; Das et al., 2010). 혈중 $\text{IL-1}\beta$ 는 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여에 의한 증가가 betaine 투여에 의해 완화되지 않았고 (Figure 25), 섬유화진행구간(14일)에서는 paraquat 투여에 의해 증가하지 않았다 (Figure 28). Chaudhary et al. (2006) 의 연구에 따르면 bleomycin 으로 폐섬유화를 유발시킨 모델에서 3 ~ 9 일 사이에 혈중 $\text{IL-1}\beta$ 증가가 확인되었다. 또한 $\text{IL-1}\beta$ 가 항산화 물질에 의해 감소한다는 연구결과는 있지만 산화적 스트레스가 직접적으로 관여하는지에 대한 여부는 아직 정확하게 알려지지 않았다 (Mathy-Hartert et al., 2008). 또한 profibrotic cytokine 인 $\text{TGF-}\beta 1$ 은 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일) 모두 paraquat 투여에 의한 증가가 betaine 투여에 의해 유의적으로 완화되었다 (Figure 20, 24). Paraquat 투여에 의한 $\text{TGF-}\beta 1$ 의 증가는 bleomycin 으로 유도된 폐섬유화 모델에서 $\text{TGF-}\beta 1$ mRNA 의 유의적인 증가가 3 ~ 6 일과 14 일 이후에서 발생하는 연구결과와 맥락을 같이 한다 (Chaudhary et al. 2006; Phan and Kunkel 1992). $\text{TGF-}\beta 1$ 은 activin receptor-like kinase 5 (ALK5) 와 같은 receptor 를 통해 인지되고 smad signaling 과 non smad mediated signaling 기전을 통해 EMT 를 유도하여 섬유화를 발생시킨다 (Willis and Borok 2007). 정상상태의 $\text{TGF-}\beta 1$ 은 latency associated protein (LAP1) 과 latent $\text{TGF-}\beta$ binding protein (LTBP) 과 이황화 결합된 large latent complex (LLC) 형태로 존재

하며 (Annes et al., 2003), 산화적 스트레스를 가했을 경우 이황화 결합이 끊어져 TGF- β 1 의 활성화 및 생성을 촉진시킨다는 연구결과도 보고되었다 (Kabel 2017; Pozzer et al., 2017). 또한 미세입자에 노출된 폐에서 유발된 산화적 DNA 손상이 섬유아세포를 활성화시킨다는 연구도 보고되었다 (Kostyuk et al., 2013; Moller et al., 2013). 이러한 결과들을 종합하면, 산화적 스트레스의 영향을 받는 TNF- α 와 TGF- β 1 의 증가가 betaine 투여에 의한 완화를 확인할 수 있었다. 따라서 산화적 스트레스가 폐염증 및 섬유화 발생에 대한 중요한 요인임을 암시한다.

Betaine 투여는 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일)에서 paraquat 투여에 의한 림프구의 산화적 DNA 손상을 완화시켰고 (Figure 31, 34), 산화적 손상 지표인 단백질 HO-1 과 iNOS 의 발현 증가를 감소시켰다 (Figure 32, 35). NF- κ B 는 염증진행구간(4일)에서만 paraquat 투여에 의해 증가했고, betaine 투여에 의해 완화되었다 (Figure 35). 많은 연구에 따르면, NF- κ B 는 활성산소종, 중금속, UV, 병원균 과 같은 다양한 자극에 의해 유도된다고 알려져 있다 (Brasier 2006; Gilmore 1999, 2006; Perkins 2007; Tian and Brasier 2003). 특히 산화적 스트레스는 MAPK 를 통해 TNF- α 를 활성화시키고 NF- κ B 를 매개하여 염증반응에 관여하는 다양한 유전자를 발현시킨다 (Poli et al., 2004). 따라서 염증진행구간(4일)에서만 변화를 보였던 TNF- α 와 상호작용에 의해 NF- κ B 도 같은 기간에서 변화가 발생했다고 추정할 수 있다. 이처럼 섬유화가 진행되는 폐에서 betaine 의 투여는 paraquat 투여에 의해 유발된 산화적 스트레스를 유의적으로 완화하였다. 이러한 betaine 의 산화적 보호효과는 섬유화가 진행되는 전체 구간에서 paraquat 으로 낮아진 조직내 활성산소종 제거능의 증가와 섬유화진행구간(14일)의 GSH/GSSG 변화를 통해 확인되었다 (Figure 33, 36, Table 5). 따라서 betaine 은 폐조직이 갖는 항산화능의 증진을 통해 산화적 손상으로부터 보호한다는 것을 의미한다.

섬유화가 진행되는 폐에서 산화적 보호효과를 통한 염증반응 및

섬유화 억제를 확인했다. 본 실험실에서는 betaine 투여에 의해 유발된 황함유 아미노산의 변화를 통해서 손상된 간의 보호작용을 확인하였다 (Jung et al., 2013; Kim and Kim 2002; Kim et al., 2009; Kim et al., 2005). 따라서, paraquat 투여에 의해 섬유화가 진행되는 모델에서 황함유 아미노산 변화에 대한 betaine 의 영향을 확인하였다(Table 5, 6, Figure 37, 38).

염증진행구간(4일)에서 methionine 은 betaine 단독투여군과 paraquat 단독투여군에서 증가하는 경향을 보였고, 섬유화진행구간(14일)에서 methionine 은 betaine 단독투여군에서 유의적인 증가를 확인하였다. SAM 은 섬유화진행구간(14일)에서 betaine 단독투여에 의해 MAT II 증가를 동반한 유의적인 증가를 보였다. 이러한 결과는 선행 실험에서 확인된 betaine 투여에 의한 신장의 methionine, MAT II, 그리고 SAM 의 증가와 맥락을 같이 한다. Paraquat 단독투여군에서는 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일) 모두 증가하는 경향을 보였지만 유의적이지 않았다. 이러한 결과는 Table 1 에서 확인된 2 주 시간 대에서의 methionine 결핍은 본 실험에서 확인되지 않았지만, paraquat 투여에 대한 보호기전이 가동된 상태로 보여진다. SAH 는 SAM 의 변화 양상에 영향을 받는 것으로 보여진다. Homocysteine 은 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여에 의해 증가하였고, 섬유화진행구간(14일)에서는 증가하는 경향을 보였지만 유의적이진 않았다. 또한 간 손상 모델에서 확인된 betaine 투여에 의한 homocysteine 감소와는 반대로 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일)에서 모두 betaine 투여에 의해 유의적인 증가를 하였다. 이러한 결과는 homocysteine 을 remethylation 시키는 BHMT 결핍에 의한 결과임을 시사한다. Cysteine 은 taurine 및 GSH 의 합성의 주요 전구체로서 cysteine 의 농도는 두 물질 합성에 결정적인 역할을 할 뿐만 아니라, 효소 CDO 와 GCLC 의 활성화에 의해서 cysteine 의 농도 역시 영향을 받는다. Cysteine 은 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여에 의한 CDO 와 GCLC 의 감소에 의해 증가하였고, 섬유화진행구간(14일)에서 CDO 발

현 감소와 함께 증가했다. Paraquat 투여에 대한 CDO 의 변화는 Table 1 의 결과와 맥락을 같이 한다. Paraquat 과 betaine 병용투여 군의 cysteine 은 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여군보다 높았고, 섬유화진행구간(14일)에서는 GCLC 의 증가와 함께 control 군 수준으로 낮아졌다. GCL 은 GSH 의 합성의 속도 조절 효소이며 활성을 조절하는 GCLM 과 GSH 합성을 담당하는 GCLC 로 구성되어 있다. 일반적으로 알려진 간내 cysteine 은 glutamate 와 glycine 에 비해 농도가 현저히 낮기 때문에, GCL 에 의해 cysteine 으로부터 γ -glutamylcysteine 이 생성되는 반응은 GSH 합성 정도를 결정하게 된다 (Lu 2009). 본 실험의 염증진행구간(4일)에서 GCL 활성 및 발현은 paraquat 에 의해 감소하였다. GCL 의 조절은 아직 잘 알려지진 않았지만 임상적으로 심각한 상태의 COPD 환자들에게서 GSH 를 생합성하는 GCLC 가 감소가 확인되었다 (Harju et al., 2002; Malhotra et al., 2008). 하지만 섬유화진행구간(14일)에서는 paraquat 투여에 의해 감소한 GCLC 발현이 betaine 투여에 의해 유의적으로 증가하였다. 많은 연구에서 항산화 물질을 투여하였을 때 GCLC 의 발현 증가를 보고하였다. Quercetin 은 HepG2 cell 의 GCL 활성을 증가시켜 GSH 농도를 상승시켰다 (Scharf et al., 2003). 또한 kaempferol 과 apigenin 은 COS-1 cell 에 처리하였을 때 GCL mRNA 발현을 증가시켰다 (Myhrstad et al., 2002). 녹차의 성분인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 는 hepatic stellate cell (HSC) 의 GCLC 유전자 발현을 촉진시켜 GSH 를 증가시켰으며, 활성화된 HSC 의 세포 분열을 억제하였다 (Fu et al., 2008). 또한 같은 EGCG 200 mg/kg 을 경구 투여 하였을때, 세포내 항산화 효소발현을 조절한다고 알려진 전사인자인 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) 의존적으로 간내 GCL 발현을 증가 시켰다 (Shen et al., 2005). GSH 는 산화적 스트레스 및 독성 물질로부터 세포 및 조직을 보호하는 중요한 역할을 담당하는 내인성 물질이다. 본 실험에서 paraquat 투여에 의해 GCLC 발현이 줄었음에도 불구하고 염증진행구간(4일)에서 total GSH 는 변화가

없었다. 반면, betaine 과의 병용투여에 의해 paraquat 투여군 대비 유의적으로 증가한 cysteine 과 함께 total GSH 은 유의적 증가를 보였다. 섬유화진행구간(14일)에서는 paraquat 투여에 의한 GCLC 의 감소와 함께 total GSH 은 유의적인 감소를 보였고 betaine 과의 병용투여에 의한 GCLC 의 증가에 의해서 cysteine 축적 억제와 control 수준의 GSH 회복이 관찰되었다. 이러한 결과는 paraquat 투여로 인한 CDO 감소와 betaine 투여에 의한 GCL 의 증가가 원인이 되어 GSH 합성의 증가 및 항성성 유지를 시킨 것으로 보여진다. Hypotaurine 은 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여에 의해 증가하였지만 betaine 과의 병용투여에 의한 변화는 보이지 않았다. 섬유화진행구간(14)일에서 hypotaurine 은 betaine 단독투여에 의해 유의적으로 증가하였는데, 이 결과는 betaine 에 의한 신장의 황함유 아미노산 대사변화와 결과를 같이 한다 (Kim et al., 2014). Hypotaurine 은 taurine 의 전구체이자 항산화 물질로 알려져 있다. 또한 최근 연구에서 랫트의 태반 영향포에서 발생하는 세포독성을 완화시켰다는 보고도 있다 (Nishimura et al., 2015). Taurine 은 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일)에서 모두 변화가 없었다. Table 1 의 2 주 시간대의 결과에서 확인되었던 paraquat 투여에 의한 taurine 의 유의적인 증가는 확인되지 않았지만, 24 시 시간대와 1 주 시간대의 사이의 측정값으로 예측했을때, 염증진행구간(4일)에서 변화가 없음을 설명할 수 있다. Taurine 의 경우 간내 CDO 를 knock out 시킨 마우스에 taurine free diet 를 섭취시켰을 때 간 내 taurine 의 농도는 변화를 보이지 않았다 (Ueki et al., 2012). 이러한 연구결과는 taurine 의 농도는 비교적 잘 유지되며 이것은 taurine 의 중요한 기능인 삼투압 조절이 매우 중요하기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 황함유 아미노산의 변화를 종합하면, betaine 투여에 의한 methionine 의 증가가 cysteine availability 를 증가시키고 CDO 의 억제와 함께 GSH 의 합성을 유도하여 paraquat 단독투여로 인해 발생하는 항산화능의 항상성을 유지 및 증진시킨다고 보고있다.

Betaien 투여에 의한 변화는 polyamine 합성 기전에서도 확인

됐다. 염증진행구간(4일)에서 ornithine, putrescine, spermidine, spermine 모두 paraquat 투여에 의해 유의적인 증가를 보였고, betaine 과의 병용투여는 아무런 변화를 유도하지 않았다. Paraquat 투여에 의한 ornithine 과 putrescine 의 증가는 Table 1 의 24 시 시간대와 1 주 시간대의 사이의 측정값으로 예측했을 때, 염증진행구간(4일)의 유의적인 증가를 설명할 수 있다. Spermidine 과 spermine 의 증가는 전구체인 putrescine 과 SAM 의 증가에 의해 유발되었다고 예상된다. 섬유화진행구간(14일)에서 paraquat 투여에 의한 ornithine 과 putrescine 의 증가는 확인되지 않았다. 하지만 betaine 과의 병용투여에 의해 putrescine 은 유의적인 증가를 보였다. Spermidine 과 spermine 은 paraquat 투여에 의해 감소하는 경향을 보였고, betaine 과의 병용투여에 의해 유의적인 증가를 보였다. Spermidine 과 spermine 은 polyamine 중에서 유효성분으로 알려져 있으며 aminopropyltransferase (spermidine synthase, spermine synthase)에 의해 putrescine 과 spermidine 에 각각 dcSAM 과의 축합에 의하여 합성된다 (Pegg 2008). dcSAM 은 SAM 으로 부터 SAMDC 를 통하여 생성되기 때문에, betaine 투여에 의한 SAM 의 증가가 spermidine, spermine 의 증가 원인으로 제시된다. Betaine 투여에 의한 putrescine 의 증가는 polyamine 의 항상성을 유지시키는 spermidine/spermine-N-acetyltransferase (SSAT) 에 의하여 발생한 것으로 예상된다. 따라서 betaine 투여에 의한 polyamine 합성 증가는 폐섬유화에 대한 보호효과에 영향을 미치는지 추후에 연구해 볼 가치가 있다.

본 실험 결과를 종합하면 betaine 투여는 황함유 아미노산과 관련 물질들의 조절을 유도하여 손상된 폐의 항산화능 유효성을 증가시켰고 결과적으로 염증반응 및 섬유화 억제를 완화하였다. 다양한 물질에 의해 손상된 간을 통한 많은 연구에서 betaine 은 BHMT 를 통한 황함유 아미노산 대사조절에 의해 산화적 보호효과가 있음을 확인하였다 (Jung et al., 2013; Kim and Kim 2002; Kim et al., 2009; Kim et

al., 2005). Paraquat 투여로 유발시킨 폐섬유화 모델에서 대부분의 황함유 아미노산 및 polyamine 은 염증진행구간(4일)에서 유의적으로 증가하였고, 섬유화진행구간(14일)에서는 control 군의 수준으로 감소하였다 (Figure 39, 40). Betaine 의 투여는 BHMT 가 발현하지 않음에도 불구하고 paraquat 투여에 의해 감소하는 황함유 아미노산 유효성을 증가시켰다 (Figure 41). Kim et al., (2014)의 연구결과와 같이 betaine 단독투여에 의한 methionine 의 증가를 확인하였고, paraquat 투여에 의해 섬유화가 진행되는 모델에서 betaine 과의 병용투여에 의한 SAM, homocysteine, cysteine 의 증가와 내인성 보호물질인 GSH 과 polyamine 의 증가를 확인하였다. 이러한 변화는 paraquat 투여에 의해 유발된 산화적 스트레스 및 염증반응을 억제하였고, 결과적으로 조직 병리학적 진단에서 다양한 증상과 폐섬유화를 완화하였다. 따라서 본 연구는 betaine 투여가 폐와 같은 간 이외의 장기에서도 항산화능을 향상시켜 산화적 손상으로부터 보호효과가 있음을 보여주는 첫 연구라는 점에 큰 의의를 갖는다. 또한 황함유 아미노산 대사를 증진시켜 자체적 보호기전의 가용성을 증가시키는 약물작용점 역시 지속적으로 연구할 가치가 있다. 따라서 폐와 같은 간 이외의 장기에서 황함유 아미노산 관련 대사와 효소들의 심도 있는 연구와 이해가 필요하다.

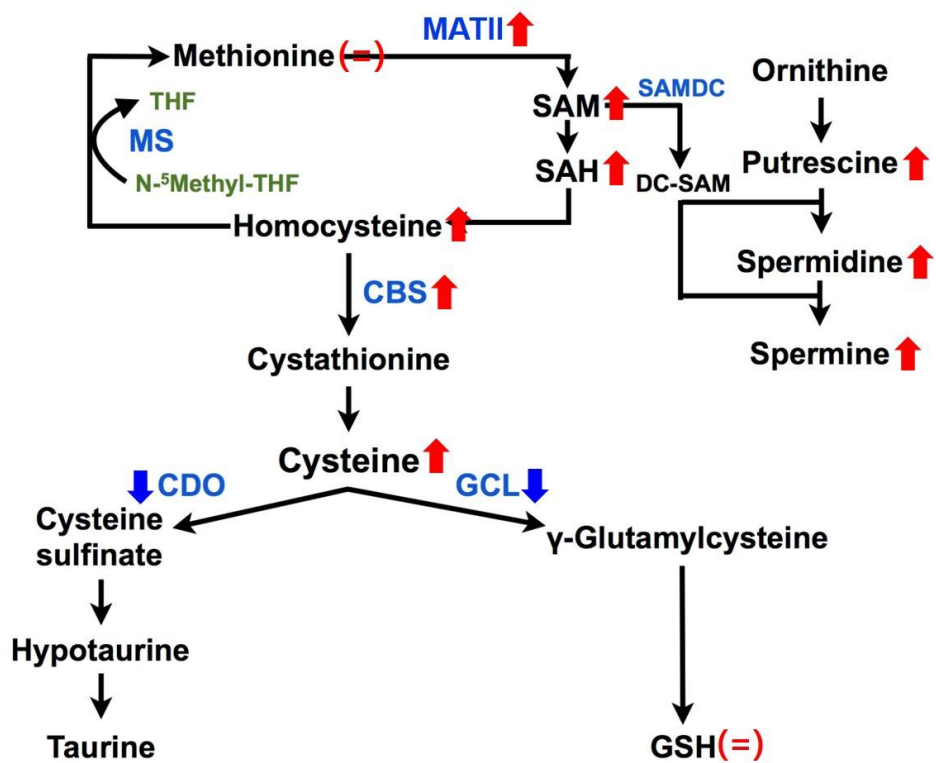


Figure 39. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 4 day after PQ instillation.

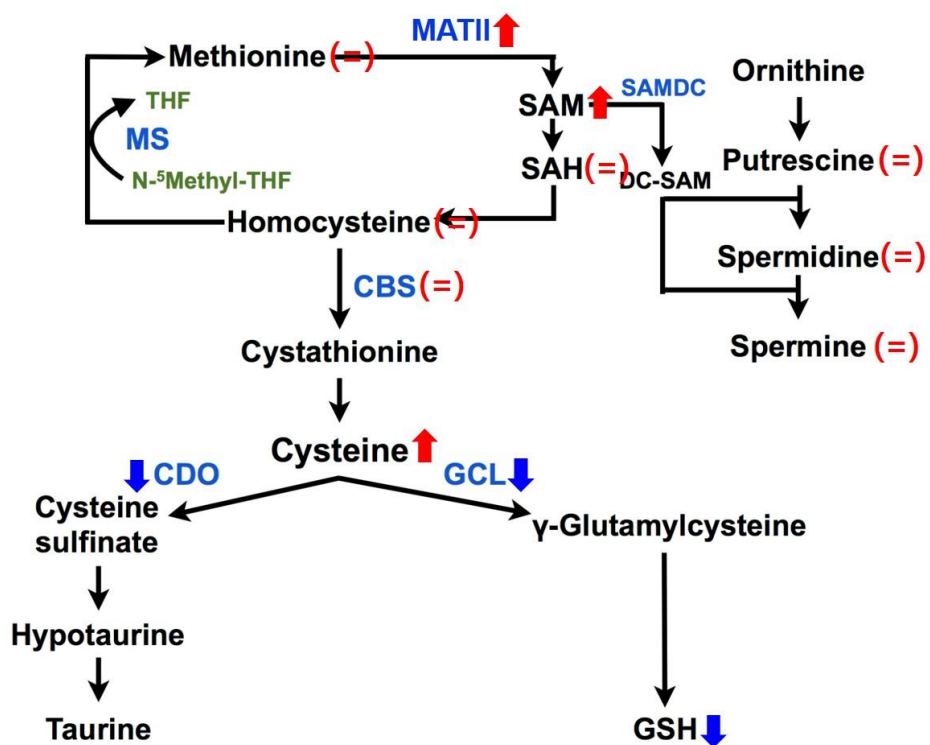


Figure 40. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 14 day after PQ instillation.

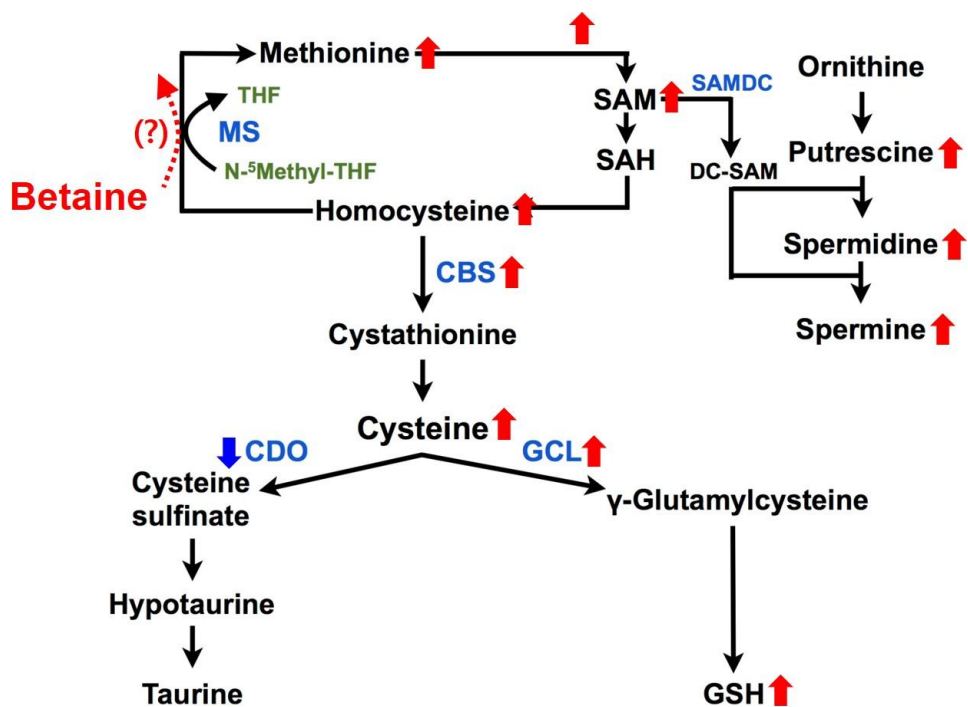


Figure 41. Changes of metabolomics of S-containing amino acid in the lung at 14 day after PQ instillation with betaine intake.

결 론

본 연구는 BHMT 가 부재한 폐에서 산화적 손상에 대한 betaine 의 보호효과를 확인하고 그 기전을 규명하기 위해 수행되었다.

1. 염증진행구간(4일)과 섬유화진행구간(14일) 모두 betaine 투여는 paraquat 으로 유발시킨 림프구의 산화적 DNA 손상을 완화하였고 폐실질 조직에서 산화적 스트레스 지표인 HO-1 과 iNOS 를 완화하였다.
2. 염증진행구간(4일)에서 paraquat 의 투여는 cytokine 인 혈중 IL-1 β , TGF- β 1 와 조직내 TNF- α 를 증가시켰다. 또한 염증반응에도 관여하는 NF- κ B 의 단백질 발현 역시 증가하였다. Betaine 투여는 paraquat 투여로 인해 증가한 혈중 TGF- β 1 과 조직내 TNF- α 를 감소시켰고, NF- κ B 의 발현을 유의적으로 감소시켰다.
3. 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여군, paraquat 과 betaine 병용투여군에서 모두 세포벽 비후화 및 염증세포 침윤이 확인되었다. 하지만 paraquat 투여군에서 발견된 다핵거세포 및 호산성, 호염성 물질들은 betaine 과의 병용투여군에서 발견되지 않았다.
4. 섬유화진행구간(14일)에서 paraquat 에 의해 유발된 섬유화를 포함한 여러 병변들은 betaine 투여에 의해 모두 완화되었다.

5. 염증진행구간(4일)에서 paraquat 투여에 의한 methionine 의 증가와 MAT II 의 발현 증가를 동반한 SAM 의 증가가 확인되었다. SAH, homocysteine 이 증가하였고 C β S 의 발현 증가와 CDO 의 발현 감소에 의해 cysteine 은 증가하였지만 GCL 감소에 의해 GSH 은 변화는 없었다. 하지만 betaine 과의 병용투여에 의해 발생한 cysteine 의 급격한 증가는 GCL 감소에도 불구하고 GSH 를 유의적으로 증가시켰다.
6. 섬유화진행구간(14일)에서 betaine 단독투여에 의한 methionine 의 증가가 확인되었고 MAT II 의 증가도 확인되었다. SAM 의 증가와 함께 polyamine 의 합성 증가 및 SAH, homocysteine 이 증가하였다. Paraquat 투여에 의한 CDO 의 감소는 cysteine 을 축적시켰으나 GCL 의 감소에 의해 GSH 는 감소하였고, betaine 투여에 의한 C β S 와 GCL 증가에 의해 cysteine 축적 억제와 GSH 합성 증가가 발생하였다.
7. 이 결과는 paraquat 을 투여하였을 때 발생하는 폐의 보호기전에 서 황함유 아미노산 대사의 중요한 역할을 확인하였고, betaine 투여에 의해 황함유 대사체의 유효성을 증가시켜 항산화 방어능을 증가시켰음을 의미한다.

참고 문헌

2016 WHO 보도 자료

http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/

2017 WHO 보도자료

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Abdelaziz, M.M., Samman, Y.S., Wali, S.O. and Hamad, M.M. 2005. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: is there anything new? *Respirology* 10, 284–289.

Adamson, I.Y. and Bowden, D.H. 1977. Origin of ciliated alveolar epithelial cells in bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol* 87, 569–580.

Ahn, C.W., Kwon, D.W., Jun, D.S., Lee, Y.M., and Kim, Y.C. 2015. Enhancement of cysteine catabolism into taurine impacts glutathione homeostasis in rats challenged with ethanol. *Amino Acid* 47, 1273–1277.

Altintas, N., Erboga, M., Aktas, C., Bilir, B., Aydin, M., Sengul, A., Ates, Z., Topcu, B. and Gurel, A. 2016. Protective Effect of Infliximab, a Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor, on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation* 39, 65–78.

Anderson, D., Yu, T.W., Dobrzynska, M.M., Ribas, G. and Marcos, R. 1997. Effects in the comet assay of storage conditions on human blood. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 17, 115–125.

Anderton, M.J., Mellor, H.R., Bell, A., Sadler, C., Pass, M.,

- Powell, S., Steele, S.J., Roberts, R.R. and Heier, A. 2011. Induction of heart valve lesions by small-molecule ALK5 inhibitors. *Toxicologic pathology* 39, 916–924.
- Angel, L.P., Tomas, M., Jose, M.S., and Jan, P.K. 2013. Human cystathionine β -synthase (CBS) contains two classes of binding sites for S-adenosylmethionine (SAM): complex regulation of CBS activity and stability by SAM. *Biochem J* 449, 102–121.
- Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. 2003. Making sense of latent TGF beta activation. *J Cell Sci* 15, 217–224.
- Arreto, C.D., Dumarey, C., Nahori, M.A., and Vargaftig, B.B. 1997. The LPS-induced neutrophil recruitment into rat air pouches is mediated by TNF: likely macrophage origin. *Med Inflam* 6, 335–343.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. 1988. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256, 251–255.
- Atkinson, J.E., Olson, J.W., Altieri, R.J. and Gillespie, M.N. 1987. Evidence that hypoxic pulmonary vascular remodeling in rats is polyamine dependent. *J Appl Physiol* (1985) 62, 1562–1568.
- Avila, M.A., Berasain, C., Torres, L., Martin-Duce, A., Corrales, F.J., Yang, H., Prieto, J., Lu, S.C., Caballeria, J., Rodes, J. and Mato, J.M. 2000. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 33, 907–914.
- Banerjee, R. and Zou, C.G. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine- β -synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of biochemistry and biophysics* 433, 144–156.

- Bannai, S. 1984. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 779, 289–306.
- Battaglia, V., DeStefano Shields, C., Murray–Stewart, T. and Casero, R.A., Jr. 2014. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention. *Amino Acids* 46, 511–519.
- Bella, D.L., Hahn, C. and Stipanuk, M.H. 1999. Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol* 277, E144–153.
- Bhattacharyya S., Wei J., Tourtellotte W.G., Hinchcliff M., Gottari C.G., Varga J. 2012. Fibrosis in systemic sclerosis: common and unique pathology. *Fibrogenesis Tissue repair* doi: 10.1186/1755-1536-5-s1-s18.
- Bingula, R., Dupuis, C., Pichon, C., Berthon, J.Y., Filaire, M., Pigeon, L. and Filaire, E. 2016. Study of the Effects of Betaine and/or C-Phycocyanin on the Growth of Lung Cancer A549 Cells In Vitro and In Vivo. *J Oncol* 2016, 8162952.
- Bismuth, C., Hall, A.H., Baud, F.J. and Borron, S. 1996. Pulmonary dysfunction in survivors of acute paraquat poisoning. *Veterinary and human toxicology* 38, 220–222.
- Bismuth, C., Scherrmann, J.M., Garnier, R., Baud, F.J. and Pontal, P.G. 1987. Elimination of paraquat. *Human toxicology* 6, 63–67.
- Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Hunninghake, G.W. and Crystal, R.G. 1982. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts. Regulation and partial characterization. *J Clin Invest* 70, 806–822.
- Brait, M., Ling, S., Nagpal, J.K., Chang, X., Park, H.L., Lee, J.,

- Okamura, J., Yamachita, K., Sidransky, D., and Kim, M.S. 2012. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers. *PLoS One* 7, 244951.
- Brasier, A.R. 2006. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovascular toxicology* 6, 111–130.
- Cantor, J.O., Osman, M., Cerreta, J.M., Suarez, R., Mandl, I. and Turino, G.M. 1984. Amiodarone-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Exp Lung Res* 6, 1–10.
- Caron, P.C., Cote, L.J. and Kremzner, L.T. 1988. Putrescine, a source of gamma-aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J* 251, 559–562.
- Chaudhary, N.I., Schnapp, A. and Park, J.E. 2006. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 769–776.
- Chen, C., Guan, X., Quinn, D.A. and Ouyang, B. 2015. N-Acetylcysteine Inhibits Ventilation-Induced Collagen Accumulation in the Rat Lung. *Tohoku J Exp Med* 236, 255–261.
- Choumenkovitch, S.F., Selhub, J., Bagley, P.J., Maeda, N., Nadeau, M.R., Smith, D.E. and Choi, S.W. 2002. In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr* 132, 2157–2160.
- Clark, J.G. and Kuhn, C., 3rd. 1982. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters: effect of neutrophil depletion on lung collagen synthesis. *The American review of respiratory*

- disease 126, 737–739.
- Cooper, A.J. 1983. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annual review of biochemistry* 52, 187–222.
- Copland, G.M., Kolin, A. and Shulman, H.S. 1974. Fatal pulmonary intra-alveolar fibrosis after paraquat ingestion. *The New England journal of medicine* 291, 290–292.
- Craig, S.A. 2004. Betaine in human nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 80, 539–549.
- Cu, A., Ye, Q., Sarria, R., Nakamura, S., Guzman, J., and Costabel, U. 2009. N-acetylcysteine inhibits TNF- α , sTNFR, and TGF- β 1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 26, 147–154.
- Das, J., Ghosh, J., Manna, P., and Sil, P.C. 2010. Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation. *Toxicology* 269, 24–34.
- Day, B.J. 2008. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10, 355–370.
- DeLeve, L.D. and Kaplowitz, N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52, 287–305.
- Dinis-Oliveira, R.J., De Jesus Valle, M.J., Bastos, M.L., Carvalho, F. and Sanchez Navarro, A. 2006a. Kinetics of paraquat in the isolated rat lung: Influence of sodium depletion. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 36, 724–737.
- Dinis-Oliveira, R.J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J.A., Navarro, A.S., Bastos, M.L. and Carvalho, F. 2006b. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*

- 27, 1110–1122.
- Dinis–Oliveira, R.J., Sousa, C., Remiao, F., Duarte, J.A., Navarro, A.S., Bastos, M.L. and Carvalho, F. 2007. Full survival of paraquat–exposed rats after treatment with sodium salicylate. *Free Radic Biol Med* 42, 1017–1028.
- Driscoll, K.E., Maurer, J.K., Higgins, J. and Poynter, J. 1995. Alveolar and growth factor production in a rat model of crocidolite–induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Journal of toxicology and environmental health* 46, 155–169.
- Du Bois, R.M. 2005. Is idiopathic pulmonary fibrosis now treatable? *Am J Respir Crit Care Med* 171, 939–940.
- Eklow–Lastbom, L., Rossi, L., Thor, H. and Orrenius, S. 1986. Effects of oxidative stress caused by hyperoxia and diquat. A study in isolated hepatocytes. *Free radical research communications* 2, 57–68.
- Elsayed, N.M., Ellingson, A.S., Tierney, D.F. and Mustafa, M.G. 1990. Effects of ozone inhalation on polyamine metabolism and tritiated thymidine incorporation into DNA of rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 102, 1–8.
- Erdogan, S., Aslantas, O., Celik, S. and Atik, E. 2008. The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Research in veterinary science* 84, 18–25.
- Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M. and Mersch–Sundermann, V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566, 209–229.
- Feng, T.Y. and Chiang, K.S. 1984. The persistence of maternal inheritance in *Chlamydomonas* despite hypomethylation of

- chloroplast DNA induced by inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3438–3442.
- Fernandez–Checa, J.C., Kaplowitz, N., Garcia–Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E. and Morales, A. 1997. GSH transport in mitochondria: defense against TNF–induced oxidative stress and alcohol–induced defect. *Am J Physiol* 273, G7–17.
- Finkelstein, J.D., Cello, J.P. and Kyle, W.E. 1974. Ethanol–induced changes in methionine metabolism in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 61, 525–531.
- Finkelstein, J.D., Harris, B.J., Martin, J.J. and Kyle, W.E. 1982a. Regulation of hepatic betaine–homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem Biophys Res Commun* 108, 344–348.
- Finkelstein, J.D. and Martin, J.J. 1984. Inactivation of betaine–homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 118, 14–19.
- Finkelstein, J.D., Martin, J.J., Harris, B.J. and Kyle, W.E. 1982b. Regulation of the betaine content of rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 218, 169–173.
- Finkelstein, J.D., Martin, J.J., Harris, B.J. and Kyle, W.E. 1983. Regulation of hepatic betaine–homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *J Nutr* 113, 519–521.
- Fleckenstein, K., Zgonjanin, L., Chen, L., Rabbani, Z., Jackson, I.L., Thrasher, B., Kirkpatrick, J., Foster, W.M. and Vujaskovic, Z. 2007. Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation. *International journal of radiation*

- oncology, biology, physics 68, 196–204.
- Fozard, J.R., Part, M.L., Prakash, N.J., Grove, J., Schechter, P.J., Sjoerdsma, A. and Koch–Weser, J. 1980. L–Ornithine decarboxylase:an essential role in early mammalian embryogenesis. *Science* 208, 505–508.
- Fu, S., Zou, X., Wang, X. and Liu, X. 1998. Determination of polyamines in human prostate by high–performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 709, 297–300.
- Fu, Y., Zheng, S., Lu, S.C. and Chen, A. 2008. Epigallocatechin–3–gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis. *Molecular pharmacology* 73, 1465–1473.
- Gadek, J.E., Hunninghake, G.W., Zimmerman, R.L. and Crystal, R.G. 1980. Regulation of the release of alveolar macrophage–derived neutrophil chemotactic factor. *The American review of respiratory disease* 121, 723–733.
- Gaitonde, M.K. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem J* 104, 627–633.
- Ganesan, B., Anandan, R. and Lakshmanan, P.T. 2011. Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats. *Cell stress & chaperones* 16, 641–652.
- Garcia–Perez, A. and Burg, M.B. 1991. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71, 1081–1115.
- Germano, M.P., De Pasquale, R., D'Angelo, V., Catania, S., Silvari, V. and Costa, C. 2002. Evaluation of extracts and isolated

- fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *J Agric Food Chem* 50, 1168–1171.
- Gilmore, T.D. 1999. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18, 6842–6844.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.
- Gould, V.E. and Miller, J. 1975. Sclerosing alveolitis induced by cyclophosphamide. Ultrastructural observations on alveolar injury and repair. *Am J Pathol* 81, 513–530.
- Grant, C.M., MacIver, F.H. and Dawes, I.W. 1997. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular biology of the cell* 8, 1699–1707.
- Greenberg, D.B., Lyons, S.A. and Last, J.A. 1978. Paraquat-induced changes in the rate of collagen biosynthesis by rat lung explants. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 92, 1033–1042.
- Griffith, O.W. 1980. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione-Reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal Biochem* 106, 207–212.
- Grossman, E.B. and Hebert, S.C. 1989. Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: characterization and modulation. *Am J Physiol* 256, F107–112.
- Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M. and Casero, R.A., Jr. 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America 95, 11140–11145.
- Hacker, A.D., Tierney, D.F. and O'Brien, T.K. 1983. Polyamine metabolism in rat lungs with oxygen toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 491–496.
- Hagen, T.M. and Jones, D.P. 1989. 30 – ROLE OF GLUTATHIONE TRANSPORT IN EXTRAHEPATIC DETOXICATION1. *Glutathione Centennial*, Academic Press, pp. 423–433.
- Haley, T.J. 1979. Review of the toxicology of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride). *Clinical toxicology* 14, 1–46.
- Harju, T., Kaarteenaho-Wiik, R., Soini, Y., Sormunen, R. and Kinnula, V.L. 2002. Diminished immunoreactivity of gamma-glutamylcysteine synthetase in the airways of smokers' lung. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 754–759.
- Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., Matsumoto, K., Maruoka, S. and Horie, T. 2001. Transforming growth Factor- β 1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH₂-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 152–157.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Cook, M.W. and Robbins, M.C. 2003. Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies. *Food Chem Toxicol* 41, 1685–1700.
- Horio, M., Ito, A., Matsuoka, Y., Moriyama, T., Orita, Y., Takenaka, M. and Imai, E. 2001. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association*

- European Renal Association 16, 483–490.
- Holguin, F., Moss, I., Brown, L.A. and Guidot, D.M. 1998. Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats. *J Clin Invest* 101, 761–768.
- Huang, C.S., Anderson, M.E. and Meister, A. 1993. Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268, 20578–20583.
- Huang, C.S., Moore, W.R. and Meister, A. 1988. On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2464–2468.
- Hutter, D.E., Till, B.G. and Greene, J.J. 1997. Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Experimental cell research* 232, 435–438.
- Hwang, C., Sinskey, A.J. and Lodish, H.F. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496–1502.
- Iacomino, G., Picariello, G. and D'Agostino, L. 2012. DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1745–1755.
- Igarashi, K. and Kashiwagi, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 39–51.
- Jack, C.I., Cottier, B., Jackson, M.J., Cassapi, L., Fraser, W.D. and Hind, C.R. 1996. Indicators of free radical activity in patients developing radiation pneumonitis. *International journal*

- of radiation oncology, biology, physics 34, 149–154.
- Jacobs, R.L., House, J.D., Brosnan, M.E. and Brosnan, J.T. 1998. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 47, 1967–1970.
- Janne, J., Poso, H. and Raina, A. 1978. Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim Biophys Acta* 473, 241–293.
- Janosik, M., Kery, V., Gaustadnes, M., Maclean, K.N. and Kraus, J.P. 2001. Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry* 40, 10625–10633.
- Jeffery P.K. 2001. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 15, S28–38
- Jeschke, J., O' Hagan, H.M., Zhang, W., Vatapalli, R., Calmon, M.F., Danilova, L., Nelkenbrecher, C., Van Neste, L., Bijsmans, I.T., Van England, M., Gabrieison, E., Schuebel, K.E., Winterpacht, A., Baylin, S.B., Herman, J.G., and Ahuja, N. 2013. Frequent inactivation of cysteine dioxygenase type 1 contributes to survival of breast cancer cells and resistance to anthracyclines. *Clin Cancer Res* 15, 3201–3211.
- Ji, C. and Kaplowitz, N. 2003. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 124, 1488–1499.
- Johnston, C.J., Finkelstein, J.N., Gelein, R., and Oberdorster, G. 1998. Pulmonary cytokine and chemokine mRNA levels after inhalation of lipopolysaccharide in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 46, 300–307.
- Jung, Y.S., Kim, S.J., Kwon, D.Y., Ahn, C.W., Kim, Y.S., Choi, D.W. and Kim, Y.C. 2013. Alleviation of alcoholic liver injury

- by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol* 62, 292–298.
- Kabel, A.M. 2017. Zinc/alogliptin combination attenuates testicular toxicity induced by doxorubicin in rats: Role of oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/NF- κ B signaling. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 97, 439–449.
- Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T. and Zhang, Z. 2005. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6, 56.
- Kawanami, O., Jiang, H.X., Mochimaru, H., Yoneyama, H., Kudoh, S., Ohkuni, H., Ooami, H. and Ferrans, V.J. 1995. Alveolar fibrosis and capillary alteration in experimental pulmonary silicosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1946–1955.
- Khaled, H., Mhamoued, A., Esref, D., Badie, K.J., Mojgan, N., and Diana, A. 2018. DNA damage protection by bulk and nano forms of quercetin in lymphocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease exposed to the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ). *Environ Res* 166, 10–15.
- Khan, N.A., Quemener, V. and Moulinoux, J.P. 1991. Polyamine membrane transport regulation. *Cell biology international reports* 15, 9–24.
- Kilberg, M.S. 1982. Amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *The Journal of membrane biology* 69, 1–12.
- Kim, S.K. and Kim, Y.C. 2002. Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem Toxicol* 40, 545–549.

- Kim, S.K. and Kim, Y.C. 2005. Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J Hepatol* 42, 907–913.
- Kim, S.K., Seo, J.M., Chae, Y.R., Jung, Y.S., Park, J.H. and Kim, Y.C. 2009. Alleviation of dimethylnitrosamine-induced liver injury and fibrosis by betaine supplementation in rats. *Chemico-biological interactions* 177, 204–211.
- Kim, S.K., Seo, J.M., Jung, Y.S., Kwak H.E., and Kim, Y.C. 2003. Alterations in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids induced by ethanol in rats. *Amino Acids* 24, 103–110.
- Kim, Y.C., Jung, Y.S. and Kim, S.K. 2005. Effect of betaine supplementation on changes in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids and experimental cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate. *Food Chem Toxicol* 43, 663–670.
- Kim, Y.C., Kwon, D.Y. and Kim, J.H. 2014. Alterations in the metabolomics of sulfur-containing substances in rat kidney by betaine. *Amino Acids* 46, 963–968.
- Kinnula, V.L., Fattman, C.L., Tan, R.J. and Oury, T.D. 2005. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 417–422.
- Kirkham, P.A. and Barnes, P.J. 2013. Oxidative stress in COPD. *Chest* 144, 266–273.
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Xu, Y.J., Tatemori, M., Goda, H., Niitsu, M., Shirahata, A. and Samejima, K. 2005. Control of spermidine and spermine levels in rat tissues by trans-4-methylcyclohexylamine, a spermidine-synthase inhibitor. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28, 569–573.

- Kojima, S., Miyazaki, Y., Honda, T., Kiyozumi, M., Shimada, H. and Funakoshi, T. 1992. Effect of L-cystine on toxicity of paraquat in mice. *Toxicol Lett* 60, 75–82.
- Kostyuk, S.V., Tabakov, V.J., Chestkov, V.V., Konkova, M.S., Glebova, K.V., Baydakova, G.V., Ershova, E.S., Izhevskaya, V.L., Baranova, A. and Veiko, N.N. 2013. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts. *Mutat Res* 747–748, 6–18.
- Kwon, D.Y., Jung, Y.S., Kim, S.J., Park, H.K., Park, J.H. and Kim, Y.C. 2009. Impaired sulfur–amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J Nutr* 139, 63–68.
- Kwon, Y.H. and Stipanuk, M.H. 2001. Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and gamma glutamyl cysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E804–815.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamouille, S., Xu, J. and Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178–196.
- Leibovich, S.J. and Ross, R. 1976. A macrophage–dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am J Pathol* 84, 501–514.
- Li, D., Xu, D., Wang, T., Shen, Y., Guo, S., Zhang, X., Guo, L., Li, X., Liu, L. and Wen, F. 2015. Silymarin attenuates airway inflammation induced by cigarette smoke in mice. *Inflammation* 38, 871–878.

- Li, T., Luo, N., Du, L., Zhou, J., Zhang, J., Gong, L., and Jiang, N. 2013. Tumor necrosis factor- α plays an initiating role in extracorporeal circulation-induced acute lung injury. *Lung* 19, 207–214.
- Lu, S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb j* 13, 1169–1183.
- Lu, S.C. 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Current topics in cellular regulation* 36, 95–116.
- Lu, S.C. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30, 42–59.
- Lu, S.C., Ge, J.L., Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N. 1992. Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J Clin Invest* 90, 524–532.
- Lu, S.C. and Mato J.M. 2012. S-adenosylmethionine in liver health, injury and cancer. *Physiol Rev.* 92, 1515–1542.
- Malhotra, D., Thimmulappa, R., Navas-Acien, A., Sandford, A., Elliott, M., Singh, A., Chen, L., Zhuang, X., Hogg, J., Pare, P., Tuder, R.M. and Biswal, S. 2008. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 592–604.
- Marti-Carvajal, A.J., Sola, I., Lathyris, D. and Dayer, M. 2017. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *The Cochrane database of systematic reviews* 8, Cd006612.
- Mathy-Hartert, M., Hogge, L., Sanchez, C., Deby-Dupont, G., Crielaard, J.M. and Henrotin, Y. 2008. Interleukin-1 β and

- interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis and cartilage* 16, 756–763.
- Mato, J.M., Alvarez, L., Ortiz, P. and Pajares, M.A. 1997. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 73, 265–280.
- Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L. and Lu, S.C. 2008. Methionine metabolism and liver disease. *Annual review of nutrition* 28, 273–293.
- Mehta, T.R. and Dawson, R., Jr. 2001. Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture. *Amino Acids* 20, 419–433.
- Melchiorri, D., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Hara, M., Chen, L. and Nistico, G. 1996. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 51, 1095–1099.
- Meredith, M.J. and Reed, D.J. 1982. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 257, 3747–3753.
- Messier, E.M., Day, B.J., Bahmed, K., Kleeberger, S.R., Tudor, R.M., Bowler, R.P., Chu, H.W., Mason, R.J. and Kosmider, B. 2013. N-acetylcysteine protects murine alveolar type II cells from cigarette smoke injury in a nuclear erythroid 2-related factor-2-independent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48, 559–567.
- Minerva, M.A., Alfonso, C.T., Marco-Antonio, G.C., Gustavo, P.A., Nancy, G.H., and Guillermo, E.L. 2010. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J Appl Toxicol* 30, 226–232.

- Misra, I. and Griffith, O.W. 1998. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* 13, 268–276.
- Moller, P., Danielsen, P.H., Jantzen, K., Roursgaard, M. and Loft, S. 2013. Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles. *Crit Rev Toxicol* 43, 96–118.
- Morse, C.C., Sigler, C., Lock, S., Hakkinen, P.J., Haschek, W.M. and Witschi, H.P. 1985. Pulmonary toxicity of cyclophosphamide: a 1-year study. *Experimental and molecular pathology* 42, 251–260.
- Mudd, S.H. 2011. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 157c, 3–32.
- Mudd, S.H. and Poole, J.R. 1975. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism: clinical and experimental* 24, 721–735.
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R. and Moskaug, J.O. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32, 386–393.
- Nishimura, T., Duereh, M., Sugita, Y., Yoshida, Y., Higuchi, K., Tomi, M. and Nakashima, E. 2015. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. *Placenta* 36, 693–698.
- Ojeda-Lopez, M.A., Needleman, D.J., Song, C., Ginsburg, A., Kohl, P.A., Li, Y., Miller, H.P., Wilson, L., Raviv, U., Choi, M.C. and Safinya, C.R. 2014. Transformation of taxol-stabilized microtubules into inverted tubulin tubules triggered by a tubulin

- conformation switch. *Nature materials* 13, 195–203.
- Olson, J.W., Orlinska, U. and Gillespie, M.N. 1989. Polyamine synthesis blockade in monocrotaline-induced pneumotoxicity. *Biochem Pharmacol* 38, 2903–2910.
- Olson, S.L. 1998. Bedside musical care: applications in pregnancy, childbirth, and neonatal care. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN* 27, 569–575.
- Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. 1998. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 18, 313–329.
- Oppenheimer, L., Wellner, V.P., Griffith, O.W. and Meister, A. 1979. Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *J Biol Chem* 254, 5184–5190.
- Ou, X., Yang, H., Ramani, K., Ara, A.I., Chen, H., Mato, J.M. and Lu, S.C. 2007. Inhibition of human betaine–homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *Biochem J* 401, 87–96.
- Panayiotidis, M.I., Stabler, S.P., Ahmad, A., Pappa, A., Legros, L.H., Jr., Hernandez–Saavedra, D., Schneider, B.K., Allen, R.H., Vasiliou, V., McCord, J.M., Kotb, M. and White, C.W. 2006. Activation of a novel isoform of methionine adenosyl transferase 2A and increased S-adenosylmethionine turnover in lung epithelial cells exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 40, 348–358.
- Panayiotidis, M.I., Stabler, S.P., Allen, R.H., Ahmad, A. and White, C.W. 2004. Cigarette smoke extract increases S-adenosylmethionine and cystathionine in human lung epithelial–like (A549) cells. *Chemico–biological interactions*

147, 87–97.

- Panayiotidis, M.I., Stabler, S.P., Allen, R.H., Pappa, A. and White, C.W. 2009. Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutation Research* 674, 23–30.
- Park, H. 2006. The post-translational synthesis of a polyamine derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem* 139, 161–169.
- Park, H.K., Kim, S.J., Kwon, D.Y., Park, J.H., Kim Y.C. 2010. Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci* 87, 181–186
- Pecci, L., Montefoschi, G., Antonucci, A., Costa, M. and Cavallini, D. 2003. Methylene blue photosensitized oxidation of hypotaurine in the presence of azide generates reactive nitrogen species: formation of nitrotyrosine. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 411–416.
- Pegg, A.E. 2008. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 294, E995–1010.
- Pegg, A.E. 2014. The function of spermine. *IUBMB life* 66, 8–18.
- Pegg, A.E. 2016. Functions of Polyamines in Mammals. *J Biol Chem* 291, 14904–14912.
- Pegg, A.E. and Michael, A.J. 2010. Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* 67, 113–121.
- Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J.C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J.A. and Cleveland, J.L. 2001. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol* 21, 6549–6558.

- Perkins, N.D. 2007. Integrating cell–signalling pathways with NF–kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49–62.
- Pey, A.L., Majtan, T., Sanchez–Ruiz, J.M. and Kraus, J.P. 2013. Human cystathionine beta–synthase (C β S) contains two classes of binding sites for S–adenosylmethionine (SAM): complex regulation of C β S activity and stability by SAM. *Biochem J* 449, 109–121.
- Phan S.H. and Kunkel S.L. 1992. Lung cytokine production in bleomycin–induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung RES.* 18, 29–43.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., and Chiarpotto, E. 2004. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem* 11, 1163–1182.
- Pozzer, D., Favellato, M., Bolis, M., Invernizzi, R.W., Solagna, F., Blaauw, B. and Zito, E. 2017. Endoplasmic Reticulum Oxidative Stress Triggers Tgf–Beta–Dependent Muscle Dysfunction by Accelerating Ascorbic Acid Turnover. *Sci Rep* 7, 40993.
- Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford, W.Z. and Oster, G. 2006. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 810–816.
- Rahman, I., Yang, S.R. and Biswas, S.K. 2006. Current concepts of redox signaling in the lungs. *Antioxid Redox Signal* 8, 681–689.
- Rajendra, W. 1987. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids in Biological Samples by Precolumn Derivatization with O–Phthaldialdehyde. *Journal of Liquid Chromatography* 10, 941–955.
- Ratnam, S., Wijekoon, E.P., Hall, B., Garrow, T.A., Brosnan, M.E. and Brosnan, J.T. 2006. Effects of diabetes and insulin on

- betaine–homocysteine S–methyltransferase expression in rat liver. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 290, E933–939.
- Ross, M.H. and Murray, J. 2004. Occupational respiratory disease in mining. *Occupational medicine (Oxford, England)* 54, 304–310.
- Sahreem, S., Khan, M.R. and Khan, R.A. 2014. Effects of Carissa opaca fruits extracts on oxidatives pulmonary damages and fibrosis in rats. *BMC Complementary and alternative medicine* 14.
- Santus, P., Corsico, A., Solidoro, P., Braido, F., Di Marco, F. and Scichilone, N. 2014. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N–acetylcysteine. *COPD* 11, 705–717.
- Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte–Hermann, R. and Huber, W.W. 2003. Enhancement of glutathione and g–glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant–derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutrition and cancer* 45, 74–83.
- Schwahn, B.C., Chen, Z., Laryea, M.D., Wendel, U., Lussier–Cacan, S., Genest, J., Jr., Mar, M.H., Zeisel, S.H., Castro, C., Garrow, T. and Rozen, R. 2003. Homocysteine–betaine interactions in a murine model of 5,10–methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Faseb j* 17, 512–514.
- Schwahn, B.C., Laryea, M.D., Chen, Z., Melnyk, S., Pogribny, I., Garrow, T., James, S.J. and Rozen, R. 2004. Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase

- deficiency. *Biochem J* 382, 831–840.
- Schwartz, D.A., Van Fossen, D.S., Davis, C.S., Helmers, R.A., Dayton, C.S., Burmeister, L.F. and Hunninghake, G.W. 1994. Determinants of progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 444–449.
- Sehirli, A.O., Satilmis, B., Tetik, S., Cetinel, S., Yegen, B., Aykac, A. and Sener, G. 2016. Protective effect of betaine against burn-induced pulmonary injury in rats. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES* 22, 417–422.
- Seiler, N., Delcros, J.G. and Moulinoux, J.P. 1996. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 843–861.
- Seiler, N. and Dezeure, F. 1990. Polyamine transport in mammalian cells. *The International journal of biochemistry* 22, 211–218.
- Seiler, N., Sarhan, S., Grauffel, C., Jones, R., Knodgen, B. and Moulinoux, J.P. 1990. Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res* 50, 5077–5083.
- Selman, M., King, T.E. and Pardo, A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of internal medicine* 134, 136–151.
- Selman, M., Thannickal, V.J., Pardo, A., Zisman, D.A., Martinez, F.J. and Lynch, J.P., 3rd. 2004. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 64, 405–430.
- Shahar, E., Keidar, I., Hertzeg, E. and Barzilay, Z. 1989. Effectiveness of vitamin E and colchicine in amelioration of paraquat lung injuries using an experimental model. *Israel*

- journal of medical sciences 25, 92–94.
- She, Q.B., Nagao, I., Hayakawa, T. and Tsuge, H. 1994. A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1748–1754.
- Shen, G., Xu, C., Hu, R., Jain, M.R., Nair, S., Lin, W., Yang, C.S., Chan, J.Y. and Kong, A.N. 2005. Comparison of (–)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (–/–) mice. *Pharmaceutical research* 22, 1805–1820.
- Shi, L., Han, C., Liu, S., Liu, Y., and Xiang, X. 2019. Effects of methionine on the activity of cystathionine- β -synthase. *Wei Sheng Yan Jiu*. 48, 463–467.
- Shi, X., Flynn, D.C., Porter, D.W., Leonard, S.S., Vallyathan, V. and Castranova, V. 1997. Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation. *Annals of clinical and laboratory science* 27, 365–374.
- Shivji, M., Burger, S., Moncada, C.A., Clarkson, A.B., Jr. and Merali, S. 2005. Effect of nicotine on lung S-adenosylmethionine and development of *Pneumocystis pneumonia*. *J Biol Chem* 280, 15219–15228.
- Shohrati, M., Karimzadeh, I., Saburi, A., Khalili, H. and Ghanei, M. 2014. The role of N-acetylcysteine in the management of acute and chronic pulmonary complications of sulfur mustard: a literature review. *Inhalation Toxicology* 26, 507–523.
- Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G. and Gauldie, J. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active

- transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 100, 768–776.
- Smith, L.L. 1987. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Human toxicology* 6, 31–36.
- Smith, P. 1971. A light- and electron-microscope study of the pulmonary lesions induced in rats by paraquat. *J Pathol* 104, vii.
- Smith, P., Heath, D. and Kay, J.M. 1974. The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Pathol* 114, 57–67.
- Sobol, S.M. and Rakita, L. 1982. Pneumonitis and pulmonary fibrosis associated with amiodarone treatment: a possible complication of a new antiarrhythmic drug. *Circulation* 65, 819–824.
- Stead, L.M., Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., Vance, D.E. and Jacobs, R.L. 2006. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *The American journal of clinical nutrition* 83, 5–10.
- Stipanuk, M.K., Dminy, J.E., Jr., Lee, J.I., and Coloso, R.M. 2006. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr* 136, 1652s–1695s.
- Strieter, R.M. 2005. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 128, 526s–532s.
- Suthanthiran, M., Anderson, M.E., Sharma, V.K. and Meister, A. 1990. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 3343–3347.

- Tabor, C.W. and Tabor, H. 1984. Polyamines. Annual review of biochemistry 53, 749–790.
- Takada, A. and Bannai, S. 1984. Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. J Biol Chem 259, 2441–2445.
- Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A. and Sakamoto, Y. 1974. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. Journal of biochemistry 75, 93–103.
- Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E. and Oshima, T. 2005. Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. Biochem J 388, 427–433.
- Thannickal, V.J., Toews, G.B., White, E.S., Lynch, J.P., 3rd and Martinez, F.J. 2004. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annual review of medicine 55, 395–417.
- Tian, B. and Brasier, A.R. 2003. Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. Recent progress in hormone research 58, 95–130.
- Tomita, M. and Okuyama, T. 1994. Effect of paraquat on the malondialdehyde level in rat liver microsomes (in vitro). Archives of toxicology 68, 187–192.
- Toner, P.G., Vетters, J.M., Spilg, W.G. and Harland, W.A. 1970. Fine structure of the lung lesion in a case of paraquat poisoning. J Pathol 102, 182–185.
- Ueki, I., Roman, H.B., Hirschberger, L.L., Junior, C. and Stipanuk, M.H. 2012. Extrahepatic tissues compensate for loss of hepatic taurine synthesis in mice with liver-specific knockout of cysteine dioxygenase. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 302, E1292–1299.

- Ueki, I. and Stipanuk, M.H. 2009. 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue have a high capacity for taurine synthesis by the cysteine dioxygenase/cysteinesulfinate decarboxylase and cysteamine dioxygenase pathways. *J Nutr* 139, 207–214.
- Varela-Moreiras, G., Selhub, J., daCosta, K.-A. and Zeisel, S.H. 1992. Effect of chronic choline deficiency in rats on liver folate content and distribution. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3, 519–522.
- Vazquez-Chantada, M., Fernandez-Ramos, D., Embade, N., Martinez-Lopez, N., Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Luka, Z., Wagner, C., Anglim, P.P., Finnell, R.H., Caballeria, J., Laird-Offringa, I.A., Gorospe, M., Lu, S.C., Mato, J.M. and Martinez-Chantar, M.L. 2010. HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed during liver proliferation, differentiation, and carcinogenesis. *Gastroenterology* 138, 1943–1953.
- Vernooy, J.H., Dentener, M.A., van Suylen, R.J., Buuman, W.A., and Wouters, E.F., 2001. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor- α and infiltrating neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 569–576.
- Vitsky, A., Waire, J., Pawliuk, R., Bond, A., Matthews, D., Lacasse, E., Hawes, M.L., Nelson, C., Richards, S., Piepenhagen, P.A., Garman, R.D., Andrews, L., Thurberg, B.L., Lonning, S., Ledbetter, S. and Ruzek, M.C. 2009. Homeostatic role of transforming growth factor- β in the oral cavity and esophagus of mice and its expression by mast cells in these tissues. *Am J Pathol* 174, 2137–2149.
- Vujaskovic, Z., Anscher, M.S., Feng, Q.F., Rabbani, Z.N., Amin,

- K., Samulski, T.S., Dewhirst, M.W. and Haroon, Z.A. 2001. Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 50, 851–855.
- Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J.C., Subramanian, I.M., Martinez, F.J., Toews, G.B. and Thannickal, V.J. 2005. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *Faseb j* 19, 854–856.
- Wahl, L.M., Olsen, C.E., Sandberg, A.L. and Mergenhagen, S.E. 1977. Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 4955–4958.
- Watanabe, S., Sato, S., Nagase, S., Tomita, M. and Saito, T. 1993. Change of polyamine level in various tissues of male rats intoxicated with paraquat. *Toxicol Lett* 69, 163–170.
- Wijekoon, E.P., Hall, B., Ratnam, S., Brosnan, M.E., Zeisel, S.H. and Brosnan, J.T. 2005. Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats. *Diabetes* 54, 3245–3251.
- Willis, B.C. and Borok, Z. 2007. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *The American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology* 293, L525–534.
- Wilson, M.S. and Wynn, T.A. 2009. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal immunology* 2, 103–121.
- Woods, L.T., Camden, J.M., El-Sayed, F.G., Khalafalla, M.G., Petris, M.J., Erb, L. and Weisman, G.A. 2015. Increased Expression of TGF- β Signaling Components in a Mouse

- Model of Fibrosis Induced by Submandibular Gland Duct Ligation. PLoS One 10, e0123641.
- Whatt, I., Doss, A.W., Zavala, D.C., and Smith, L.L. 1981. Intrabronchial instillation of paraquat in rats: lung morphology and retention study. Br J Ind Med 38, 42–48.
- Xie H., Tan J.T., Wang R.L., Meng X.X., Tang X., and Gao S. 2013. Expression and significance of HIF-1 α in pulmonary fibrosis by paraquat. Exp Biol Med (maywood) 238, 1062–1068.
- Yamada, A., Aki, T., Unuma, K., Funakoshi, T. and Uemura, K. 2015. Paraquat induces epithelial–mesenchymal transition–like cellular response resulting in fibrogenesis and the prevention of apoptosis in human pulmonary epithelial cells. PLoS One 10, e0120192.
- Yang, W., Huang, L., Gao, J., Wen, S., Tai, Y., Chen, M., Huang, Z., Liu, R., Tang, C. and Li, J. 2017. Betaine attenuates chronic alcoholinduced fatty liver by broadly regulating hepatic lipid metabolism. Mol Med Rep 16, 5225–5234.
- Yap, S. and Naughten, E. 1998. Homocystinuria due to cystathionine beta–synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. Journal of inherited metabolic disease 21, 738–747.
- Yoon, S.Y., Hong, G.Y., Kwon, H.S., Park, S., Park, S.Y., Shin, B., Kim, T.B., Moon, H.B., and Cho, Y.S. 2016. S adenosyl methionine reduces airway inflammation and fibrosis in a murine model of chronic severe asthma via suppression of oxidative stress. Exp Mol Med 48, e236.
- Yin, W.L., Yin, W.G., Huang, B.S., and Wu, L.X. 2017.

- Neuroprotective effects of lentivirus-mediated cystathionine beta synthase overexpression against 6-OHDA induced parkinson's disease rats. *Neurosci Lett* 14, 45–52.
- Zeisel, S.H. 1981. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annual review of nutrition* 1, 95–121.
- Zeisel, S.H. 2006. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual review of nutrition* 26, 229–250.
- Zerin, T., Kim, Y.S., Hong, S.Y., Song, H.Y. 2013. Quercetin reduces oxidative damage induced by paraquat via modulating expression of antioxidant genes in A549 cells. *J Appl Toxicol* 33, 1460–1467
- Zhang, F., Warskulat, U. and Haussinger, D. 1996a. Modulation of tumor necrosis factor- α release by anisoosmolarity and betaine in rat liver macrophages (Kupffer cells). *FEBS Lett* 391, 293–296.
- Zhang, F., Warskulat, U., Wettstein, M. and Haussinger, D. 1996b. Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology* 110, 1543–1552.
- Zhang, L., He, Y.L., Li, Q.Z., Hao, X.H., Zhang, Z.F., Yuan, J.X., Bai, Y.P., Jin, Y.L., Liu, N., Chen, G., Yun, X. and Yao, S.Q. 2014. N-acetylcysteine alleviated silica-induced lung fibrosis in rats by down-regulation of ROS and mitochondrial apoptosis signaling. *Toxicology Mechanisms and Methods* 24, 212–219.
- Zhao, F., Shi, D., Li, T., Li, L. and Zhao, M. 2015. Silymarin attenuates paraquat-induced lung injury via Nrf2-mediated pathway in vivo and in vitro. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 42, 988–998.

Zuo, L., He, F., Sergakis, G.G., Koozehchian, M.S., Stimpfl, J.N., Rong, Y., Diaz, P.T. and Best, T.M. 2014. Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307, L205–218.

Abstract

Betaine is a methyl donor used in remethylation of homocysteine to methionine in a metabolic reaction catalyzed by betaine-homocysteine methyltransferase in the liver. However, our recent study suggests that the metabolism of sulfur-containing amino acids in extrahepatic organs may also be influenced by betaine, probably via an increase in methionine uptake from blood. In this study we investigated the effect of betaine against paraquat (PQ)-induced pulmonary injury. Male rats received betaine from 2 wk prior to an intratracheal instillation of PQ (0.3 mg/500 μ l/kg). In 2 wk after PQ instillation, there were severe inflammatory and fibrotic lesions accompanied with accumulation of 4-hydroxyproline in the lung, which were prevented effectively by betaine supplementation. Betaine intake also suppressed PQ-induced expression of HO-1 and iNOS in lung, oxidative DNA damage in lymphocytes, and elevation of TGF- β 1 in serum. PQ instillation increased cysteine, but decreased glutathione levels, however, betaine supplementation inhibited cysteine accumulation and increased glutathione synthesis. Putrescine, spermidine, and spermine levels were decreased by PQ instillation, but elevated significantly in the rats supplemented with betaine. The present results suggest that betaine may prevent oxidative lung injury by modulating the metabolism of sulfur-containing amino acids despite the lack of betaine-homocysteine methyltransferase in the lung.

Keywords: Betaine, Glutathione, Methionine, S-containing amino acid metabolism, polyamine, antioxidant, Paraquat, Pulmonary fibrosis, Oxidative stress

Student number: 2013-23459